

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BIOCHEMIE



Epigenetická modifikace DNA  
nádorových buněčných linií  
v normoxii a hypoxii

*Epigenetic modification of DNA of tumor cell  
lines in normoxia and hypoxia*

*Diplomová práce*

**Bc. Žaneta Omaña Gudiño (roz. Hejduková)**  
**školicelka: RNDr. Jitka Poljaková, Ph.D.**

**Praha 2013**

## **Prohlášení**

**Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Jitky Poljakové, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.**

**V Praze dne .....2013**

---

**Žaneta Omaña Gudiño**

## **Poděkování**

**Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucí práce RNDr. Jitce Poljakové, Ph.D. za její trpělivost, ochotu a cenné rady, připomínky a námitky, díky kterým bylo možné mou práci dokončit.**

**Dále bych chtěla poděkovat kolektivu pracovníků laboratoře kliniky dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy za pomoc při studiu a vždy příjemnou spolupráci v laboratoři. V neposlední řadě děkuji svým rodičům a manželovi, kteří mi byli při psaní této práce velkou oporou.**

## Abstrakt

Neuroblastom je jedno z nejčastěji diagnostikovaných nádorových onemocnění u dětí. Tento rychle rostoucí solidní nádor je obvykle tvořen hypoxickými oblastmi, které vznikají jako důsledek nedostatečné a neuspořádané neovaskularizace. Hypoxií stresované buňky spouští transkripci mnoha genů nutných pro jejich přežití a naopak zastavují produkci těch proteinů, které pro přežití nepříznivých podmínek nezbytně nepotřebují. Adaptace buněk na hypoxické podmínky probíhá kromě jiného díky epigenetické regulaci metabolismu spojené s přestavbou chromatinu, zahrnující kromě methylace DNA také posttranslační modifikace histonů. Mezi nejvýznamější z nich se řadí acetylace lysinových zbytků histonů, která bývá spojována s rozvolněním vlákna DNA, usnadněným navázáním transkripčních faktorů a aktivací genové exprese. První část předkládané diplomové práce se zabývá změnami v acetylaci histonů H3 a H4 lidských neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-3, UKF-NB-4, SH-SY5Y a SK-N-AS, kultivovaných paralelně při standardních kultivačních podmínkách a při nedostatku kyslíku (hypoxie, O<sub>2</sub> 1 %) po dobu 24 hodin, které jsou sledovány prostřednictvím metody Westernblot. Druhá část diplomové práce je věnována měření aktivity histonacetyltransferas a histondeacetylas, tedy enzymů, které se samotné acetylace histonů účastní, a studiu exprese proto-onkogenů N-Myc a c-Myc těchto buněčných linií v závislosti na kultivačních podmínkách (normoxie versus hypoxie po dobu 24 hodin). Experimentálně bylo zjištěno, že samotné kultivační podmínky v neuroblastomových nádorových buňkách ovlivňují acetylaci histonů H3 a H4 (v závislosti na buněčné linii). Kromě toho jsou podmínky kultivace spojené se změnou exprese proto-onkogenu N-Myc na úrovni proteinu. U tří buněčných linií charakterizovaných amplifikací či zmnožením onkogenu N-Myc hypoxické kultivační podmínky expresi tohoto onkogenu ještě více umocnily. Naproti tomu rozdíl v expresi onkogenu c-Myc v normoxii a hypoxii nebyl patrný u žádné ze čtyř studovaných neuroblastomových buněčných linií. Přesný vztah mezi oběma onkogeny doposud nebyl definován, ačkoliv se jejich funkce často překrývají.

**Klíčová slova:** acetylace histonů H3 a H4, hypoxie, neuroblastom, aktivita histonacetyltransferas a histondeacetylas, exprese proto-onkogenů c-Myc a N-Myc

## Abstract

Neuroblastoma is one of the most common cancer diseases diagnosed in children. This rapidly growing solid tumor is usually formed by hypoxic areas which arise as a consequence of inefficient and disorganized neovascularization. The cells stressed by hypoxia triggers transcription of many genes necessary for their survival, and conversely stop the production of proteins which are not necessarily needed for the survival in these severe conditions. The adaptation of cells to hypoxic conditions may appear due to the epigenetic regulation of metabolism associated with chromatin remodeling which involves the DNA methylation and also the posttranslational modifications of histones. Among the most important of these, there is the acetylation of lysine residues of histones associated with the DNA strands loosening, facilitated binding of transcription factors and the activation of gene expression. Thus, the first part of this study is concerned with changes in the acetylation of histones H3 and H4 of human neuroblastoma cell lines UKF-NB-3, UKF-NB-4, SH-SY5Y and SK-N-AS, cultured in parallel under standard culture conditions and in the absence of oxygen (hypoxia, 1% O<sub>2</sub>) for 24 hours, which are studied by Western blot analysis. Thereupon, the activity of histone deacetylases and histonacetyltransferases, the enzymes that are themselves involved in histone acetylation, is measured and the expression of proto-oncogenes N-myc and c-Myc is studied within the same cell lines, depending on the culture conditions (normoxia versus hypoxia for 24 hours). It was found experimentally that the actual cultivation conditions in neuroblastoma tumor cells affect the acetylation of histones H3 and H4 (depending on the cell line). In addition, culture conditions are associated with the change in the expression of the N-Myc proto-oncogene on the protein level. In the three cell lines characterized by amplification or multiplication of N-Myc oncogene, the hypoxic culture conditions even magnified its expression. In contrast, the difference in the expression of c-Myc oncogene in normoxia and hypoxia was not observed in any of the four studied neuroblastoma cell lines. Although their functions often overlap, the exact relationship between both oncogenes has not been defined yet.

(In Czech)

**Keywords:** histone H3 and H4 acetylation, hypoxia, neuroblastoma, histoneacetyltransferases and histonedecetylases activity, c-Myc and N-Myc expression

# Obsah

<b>1 Teoretický úvod .....</b>	<b>11</b>
1.1 Struktura chromatinu .....	12
1.2 Regulace genové exprese .....	13
1.3 Modifikace histonů .....	14
1.3.1 Methylace histonů .....	16
1.3.2 Fosforylace histonů .....	17
1.3.3 Ubiquitinylace histonů .....	19
1.3.4 ADP-ribosylace histonů .....	20
1.3.5 SUMOylace histonů .....	21
1.3.6 Deiminace a isomerace histonů .....	21
1.4 Acetylace histonů .....	22
1.4.1 Histonacetyltransferasy .....	23
1.4.2 Histondeacetylasy .....	24
1.5 Neuroblastom .....	25
1.5.1 Biologie a klinický obraz neuroblastomu .....	25
1.5.2 Staging neuroblastomu .....	27
1.6 Nedostatečné zásobení tkání kyslíkem .....	31
1.6.1 Adaptace buněk na nedostatek kyslíku .....	32
1.6.2 HIF transkripční faktory .....	33
1.6.3 Hypoxie a regulace transkripce .....	34
<b>2 Cíl diplomové práce .....</b>	<b>35</b>
<b>3 Experimentální část .....</b>	<b>36</b>
3.1 Použitý materiál a chemikálie .....	36
3.2 Přístroje .....	38
3.3 Metody .....	39
3.3.1 Rozmrazení buněk .....	39

3.3.2	Kultivace buněk .....	39
3.3.3	Pasážování buněk .....	40
3.3.4	Počítání buněk .....	40
3.3.5	Sklízení buněk .....	41
3.3.6	Kyselá extrakce s následnou dialýzou.....	41
3.3.7	Kyselá extrakce s následným srážením TCA .....	42
3.3.8	Příprava celobuněčného lyzátu .....	43
3.3.9	Stanovení proteinů .....	43
3.3.10	SDS-PAGE elektroforesa .....	44
3.3.11	Westernblot .....	45
3.3.12	Izolace nukleární buněčné frakce pro stanovení enzymových aktivit.....	46
3.3.13	Kolorimetrické stanovení aktivity HAT .....	47
3.3.14	Kolorimetrické stanovení aktivity HDAC .....	47
<b>4</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>49</b>
4.1	Acetylace histonů H3 a H4 neuroblastomových buněčných linií.....	50
4.2	Aktivita histonacetyltransferas a histondeacetylas .....	58
4.3	Exprese onkogenů c-Myc a N-Myc .....	61
<b>5</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>68</b>

## Seznam použitých zkratk

<b>AA mix</b>	směs akrylamidu a bisakrylamidu v poměru 29/1
<b>AC</b>	adenylyl cyklasa
<b>ADP</b>	adenosin difosfát
<b>ALK</b>	anaplastická lymfomová kinasa
<b>AP-1</b>	aktivátorový protein
<b>APS</b>	peroxodisíran amonný
<b>ARNT</b>	jaderný translokátor Ah receptoru
<b>ART</b>	ADP-ribosyltransferasa
<b>ATP</b>	adenosintrifosfát
<b>BDNF</b>	mozkový neurotrofní faktor
<b>bHLH-PAS</b>	“helix-loop-helix-Per-ARNT-Sim“
<b>Bre1</b>	ubiquitin-ligasa E3
<b>BSA</b>	hovězí sérový albumin
<b>cAMP</b>	cyklický adenosinmonofosfát
<b>CBP</b>	CREB-vazebný protein
<b>ccRCC</b>	karcinom ledviny
<b>COG</b>	“Children’s Oncology Group“
<b>COMPASS</b>	methyltransferasa histonu H3
<b>CREB</b>	protein vázající element responzivní pro cyklický AMP
<b>del 1p</b>	delece krátkého raménka chromosomu 1
<b>DI</b>	DNA index
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>Dot1</b>	methyltransferasa histonu H3 (“disruptor of telomeric silencing 1“)
<b>DTT</b>	dithiothreitol
<b>ECM</b>	extracelulární matrix
<b>EGF</b>	epidermální růstový faktor
<b>E1</b>	ATP-dependentní ubiquitin-aktivující enzym
<b>E2</b>	střední ubiquitin-konjugující enzym
<b>E3</b>	terminální ubiquitin-proteinová ligasa
<b>F12</b>	“Gibco® Ham's F12 Nutrient Mixture“ médium
<b>FBS</b>	fetální hovězí sérum
<b>FISH</b>	fluorescenční in situ hybridizace
<b>FKBP</b>	FK506 vazebný protein
<b>Fpr4</b>	prolinová isomerasa
<b>HAT</b>	histonacetyltransferasa
<b>HDAC</b>	histondeacetylasa
<b>HK2</b>	hexokinasa 2
<b>HIF</b>	“hypoxia-inducible“ faktor
<b>HP1</b>	heterochromatinový protein 1
<b>HMT</b>	histonmethyltransferasa
<b>HRE</b>	specifické HIF-responzivní elementy
<b>HRP</b>	křenová peroxidasa
<b>HSF1</b>	faktor tepelného šoku
<b>IC<sub>50</sub></b>	koncentrace látky způsobující 50% buněčnou inhibici
<b>IgG</b>	Imunoglobulin G



<b>IMDM</b>	“Iscove’s modified Dulbecco’s” médium
<b>INRG</b>	“International Neuroblastoma Risk Group”
<b>INRGSS</b>	“International Neuroblastoma Risk Group Staging System”
<b>jmjC</b>	doména “Jumonji C”
<b>KDM</b>	demethylasa lysinových zbytků histonů
<b>KIF1B</b>	gen kódující kinesin
<b>LOH</b>	ztráta heterozygosity
<b>Max</b>	Myc-Myc proteinový komplex X
<b>NADH</b>	nikotinamid adenindinukleotid
<b>NF-κB</b>	nukleární faktor
<b>NT-3</b>	neurotrofin-3
<b>PADI4</b>	specifická argininová deiminasa
<b>PARP</b>	Poly(ADP-ribosylová) polymerasa
<b>PAS</b>	“Per-ARNT-Sim”
<b>PBS</b>	sodný fosfátový pufr s obsahem NaCl
<b>PCAF</b>	“p300/CBP-associated factor”
<b>PCR</b>	polymerasová řetězová reakce
<b>PDK1</b>	protein-dependentní kinasa 1
<b>pH</b>	záporný dekadický logaritmus koncentrace H <sup>+</sup> iontů
<b>PHF8</b>	“PHD finger protein 8”
<b>PHOX2B</b>	gen “paired-like homeobox 2B”
<b>PKA</b>	proteinkinasa A
<b>PMSF</b>	fenylmethylsulfonylfluorid
<b>Pol II</b>	RNA polymerasa II
<b>PP-1</b>	serin/threoninová fosfatasa-1
<b>PRMT</b>	rodina argininových methyltransferas
<b>pVHL</b>	“von Hippel – Lindau” nádorový supresorový protein
<b>Rad6</b>	ubiquitin-konjugující enzym E2
<b>RNA</b>	ribonukleová kyselina
<b>RP-HPLC</b>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází
<b>Set2</b>	methyltransferasa histonu H3
<b>SDS</b>	dodecylsulfát sodný
<b>SENP</b>	sentrin-specifické proteasy
<b>SET</b>	“Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax”
<b>SIRT</b>	sirtuiny
<b>STAT</b>	proteiny transdukce signálu a aktivátory transkripce
<b>TAD</b>	transaktivační doména
<b>TBP</b>	“TATA box-binding protein”
<b>TCA</b>	trichloroctová kyselina
<b>TEMED</b>	1,2-bis (dimethylamino) ethan
<b>TFIID</b>	obecný transkripční iniciační faktor
<b>TGF</b>	transformující růstový faktor
<b>Tris</b>	1,1,1-tris (hydroxymethyl) aminomethan
<b>Trk</b>	tyrosin-kinasové receptory
<b>TWEEN 20</b>	polyoxyethylensorbitanmonolaurát
<b>Ubl</b>	“ubiquitin-like” protein
<b>Ulp</b>	Ubl-specifické proteasy
<b>USPS</b>	thiolové ubiquitin-specifické proteasy
<b>VEGF</b>	vaskulární endoteliální růstový faktor

**VPA**  
**WCL**

kyselina valproová  
celobuněčný lyzát

# 1 Teoretický úvod

Iniciace nádorového onemocnění a jeho progresu jsou spojeny s řadou genetických a epigenetických změn, které mohou vést k aktivaci onkogenů či represí nádorových supresorových genů. Epigenetické změny jsou na rozdíl od genetických změn reverzibilní a mohou být ovlivněny epigenetickou terapií. V nádorech jsou velmi často pozorovány změny metabolismu, při kterých dochází k adaptaci nádorových buněk na specifické mikroprostředí, ve kterém jsou určité živiny omezeny.<sup>1</sup> Příkladem je nedostatek kyslíku (hypoxie), který obecně přispívá ke zvýšení agresivity nádoru a vede k odlišné expresi některých proteinů.<sup>1,2</sup>

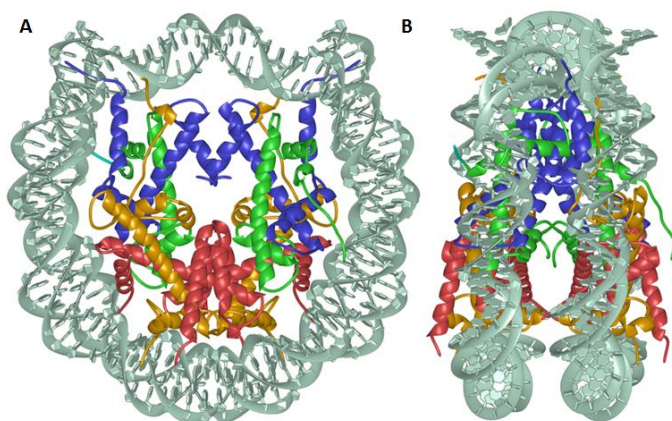
Zatímco normální buňky získávají energii z glukosy většinou oxidační fosforylací, nádorové buňky metabolizují glukosu převážně prostřednictvím glykolysu, která probíhá mnohem rychleji, což vede k růstu její spotřeby a zvýšení produkce laktátu. Pro adaptaci buněk na hypoxické podmínky jsou klíčové transkripční faktory HIF-1 $\alpha$  a HIF-2 $\alpha$ , podílející se na transkripci mnoha genů, které indukují hlavně angiogenesi a glykolysu a působí tak proti buněčné smrti.<sup>2</sup> Otto Warburg poprvé pozoroval tento jev dnes známý jako Warburgův efekt nebo aerobní glykolysa již v roce 1920.<sup>3</sup> Glukosový přenašeč GLUT1 spolu s dalšími glukosovými přenašeči jsou dodnes základem pro detekci nádorových buněk v současné klinické praxi.<sup>4,5</sup>

Nádorové buňky se musí vyrovnávat se značně stresujícím hypoxickým prostředím. Při adaptaci na hypoxické podmínky může dojít k epigenetické regulaci metabolismu spojené s přestavbou chromatinu, která zahrnuje kromě methylace DNA také posttranslační modifikace histonů. Jednou z nejvýznamějších posttranslačních modifikací histonů je jejich acetylace, která je obvykle spojena s transkripční aktivací.<sup>2,6</sup> Do metabolických regulací při nádorovém onemocnění je zapojena většina onkogenů a nádorových supresorových genů.<sup>5</sup> Enzymy zapojené do metabolismu bývají v různých nádorech geneticky pozměněny.<sup>7</sup> Společně tyto poznatky naznačují, že metabolické přepínače nejsou jen vedlejší produkty vývoje nádorového onemocnění, ale mohou zásadním způsobem přispívat k jeho iniciaci. Epigenetické enzymy vyžadují přísun přechodných metabolitů buněčného metabolismu, jakým je například acetylCoA. V případě, že je koncentrace těchto metabolitů zvýšená, může dojít k promiskuitní aktivaci způsobené zvýšenou acylací histonů.<sup>7,5</sup>

Zásadní pro změny v hladinách acetylace histonů může být také exprese transkripčních faktorů c-Myc a N-Myc.<sup>5,8</sup> Přesný vztah mezi onkogeny c-Myc a N-myc však doposud není znám.<sup>9</sup> Bylo například zjištěno, že transkripční faktor c-Myc vázající se na specifické oblasti DNA v buněčném chromatinu přímo indukuje acetylaci histonů H4 v lidských buňkách A549 s amplifikací c-Myc odvozených od alveolárního plicního karcinomu. V hypoxii naopak u těchto buněk docházelo ke snížení a následné ztrátě exprese tohoto onkogenu na úrovni proteinu spojené se snížením acetylace histonů H4.<sup>10</sup> V této diplomové práci byl sledován vliv hypoxie na acylaci histonů H3 a H4 u čtyřech neuroblastomových buněčných linií s různou expresí onkogenu N-Myc.

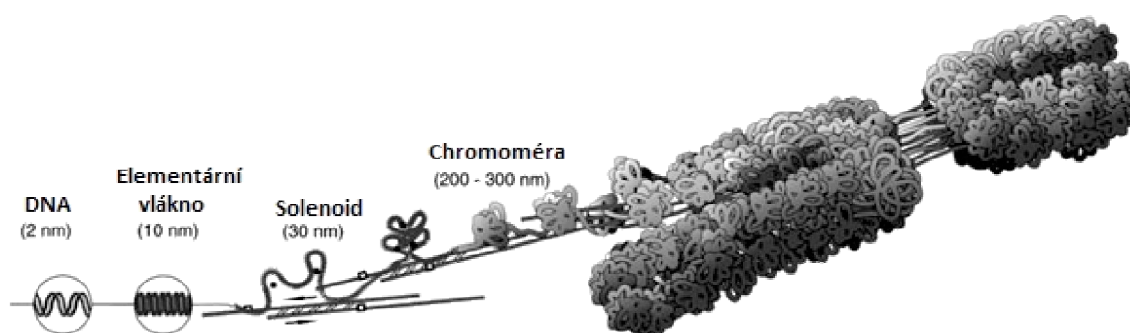
## 1.1 Struktura chromatinu

Genetická informace jednotlivých eukaryotických buněk je uložena v molekulách DNA, jejichž rozvinutá vlákna by celkem dosahovala délky až 2 m.<sup>11</sup> Hierarchický systém skládání DNA je však schopen vytvořit vysoce kompaktní nukleoproteinovou strukturu, nazývanou chromatin. Chromatinový komplex obsahuje kromě DNA proteiny histonové a nehistonové povahy. Jeho základní strukturní jednotkou je nukleosom (viz. Obrázek č. 1 na str. 12), který je tvořen oktamerním histonovým jádrem, kolem něhož je 1,65 závitů obtočeno 147 bp dlouhé vlákno DNA sbalené do levotočivé superšroubovice.<sup>12</sup> Jádro nukleosomu je složeno z tetrameru histonů  $(H4)_2 \cdot (H3)_2$  a přilehlých dimerů  $(H2A \cdot H2B)_2$ .<sup>13</sup> Nukleosom je uzavřen prostřednictvím “linkerového” histonu H1.<sup>14</sup> Jednotlivé nukleosomy jsou vzájemně propojeny prostřednictvím přibližně 55 bp dlouhé “linkerové” DNA.<sup>15</sup>



**Obrázek č. 1 - Schéma krystalové struktury nukleosomu zobrazeno ve dvou různých orientacích :**  
A) Nukleosom, pohled dolů superhelikální osou. B) Stejná struktura otočená o 90° kolem osy y.  $\alpha$ -Helixy histonových proteinů jsou zobrazeny modře (H3), zeleně (H4), žlutě (H2A) a červeně (H2B). DNA je zobrazena šedě. (Převzato z <sup>16</sup>)

Nukleosomové vlákno o průměru 10 nm připomínající korálky na niti (“beads-on-a-string”) představuje primární úroveň organizace chromatinu.<sup>17</sup> Zatímco oktamerní sestava jaderných histonů (H2A, H2B, H3 a H4) usnadňuje primární sbalení DNA v jádře eukaryotických buněk, “linkerový” histon H1 svojí vazbou na DNA stabilizuje základní chromatinové jednotky a podporuje tvorbu solenoidního 30 nm vlákna a vyšších řádů chromatinových struktur (viz. Obrázek č. 2).<sup>17,18</sup>



**Obrázek č. 2 - Uspořádání chromatinového vlákna** (Upraveno a převzato z <sup>19</sup>)

Dostupnost sbalené, vysoce organizované nukleosomové DNA pro transkripční faktory je oproti její rozvinuté formě výrazně omezena. Změny v uspořádání chromatinu hrají důležitou roli v regulaci buněčných procesů, jako je transkripce, replikace, reparace a rekombinace DNA.<sup>16,20</sup>

## 1.2 Regulace genové exprese

K regulaci transkripce nedochází pouze prostřednictvím interakcí DNA s transkripčními faktory, ale i celkovými změnami chromatinové struktury.<sup>21,22</sup> Dvěma základními morfologickými stavy chromatinu v buněčných jádrech vyšších eukaryot jsou heterochromatin a euchromatin.<sup>23</sup> V různých místech interfázního jádra se však chromatin nachází v mnoha dalších konformačních stavech, které mají rozdílnou chromosomální architekturu a transkripční aktivitu.<sup>24</sup> Přechody mezi jednotlivými konformacemi vedou ke změnám genové exprese<sup>25</sup> a k rozdílné morfologii jádra, která je přímým projevem fyziologického stavu buňky.<sup>26</sup>

V buňce euchromatin přechází dynamicky v heterochromatin a obráceně. Těsné uspořádání a špatná dostupnost pro transkripční aparát obecně řadí heterochromatin mezi transkripčně neaktivní oblasti. Euchromatin je naopak rozvolněný, málo kompaktní

a transkripčně více aktivní. Narozdíl od heterochromatinu obsahuje vysoký podíl aktivně transkribovaných genů a je volně sbalený do 10 nm vlákna.<sup>22</sup>

Konformaci chromatinu ovlivňuje řada faktorů, z nichž k nejvýznamnějším patří methylace DNA.<sup>27,28</sup> Příkladem odlišných DNA-methylačních znaků vedoucích k ovlivnění genové exprese jsou buňky nádorové tkáně, jejichž promotorové oblasti s abnormálním stupněm methylace jsou spojeny s transkripčním umlčováním<sup>29</sup> narozdíl od zdravých buněk, kde jsou promotorové oblasti naopak demethylovány. Experimenty například ukázaly, že heterochromatinové uspořádání je udržováno díky methylaci lysinového zbytku K4 histonu H3 (H3K4) a naopak euchromatinové oblasti jsou charakterizovány methylací lysinového zbytku K9 histonu H3 (H3K9).<sup>22</sup>

Dalším významným faktorem ovlivňujícím konformaci chromatinu jsou posttranslační modifikace samotných histonů. Každý z nukleosomových jaderných histonů H2A, H2B, H3 a H4 obsahuje strukturní motiv označovaný jako “histone fold“, který se skládá ze dvou krátkých alfa helixů a jednoho dlouhého centrálního helixu odděleného beta můstky. Tento strukturní motiv umožňuje interakci histonů s DNA a také dimerizaci histonů, při které každý monomer sepne svého partnera v tzv. “head-to-tail“ uspořádání.<sup>21</sup> “Histone fold“ je dále ohraničen N- a C-terminálními konci, které vyčnívají ven z nukleosomu a mají, narozdíl od oblastí obsahujících společný strukturní motiv, vzhled flexibilních nepravidelných řetězců. Například N-terminální konce tvořící cca 28 % všech jaderných histonových sekvencí jsou silně bazické v důsledku vysokého podílu kladně nabitých aminokyselinových zbytků argininu a lysinu.<sup>30,25</sup>

### 1.3 Modifikace histonů

Konce jaderných histonů vyčnívající z globulární domény vlastního nukleosomu podléhají velkému množství posttranslačních modifikací. N-terminální konce histonů mohou být modifikovány zejména acetylací, methylací a fosforylací. Méně častými modifikacemi N-konců histonů jsou SUMOylace, ADP ribosylace a deiminační isomerace argininových a prolinových zbytků.<sup>12</sup> K ubiquitylaci dochází na C-terminálních koncích histonů. Acetylaci histonů je jako jedné z nejvýznamnějších posttranslačních modifikací věnována samostatná kapitola 1.4 na str. 22.

Posttranslačně modifikované konce histonů slouží jako vazebná místa pro různé efektorové proteiny a komplexy nehistonové povahy.<sup>26,31</sup> Modifikace histonů probíhá

buď postupně, nebo společně tvoří tzv. "histonový kód", který obsahuje specifické uspořádání jednotlivých modifikací.<sup>26,31</sup> Tento druh vzájemné komunikace mezi jednotlivými modifikacemi nazývaný "cross-talk", který může nastávat několika způsoby (viz. Obrázek č. 3 na str. 16), přispívá ke komplexnímu řízení struktury chromatinu, umožňujícímu regulaci pestré škály jaderných procesů, jako jsou replikace, transkripce či opravy DNA nebo kondenzace chromosomu.<sup>32</sup>

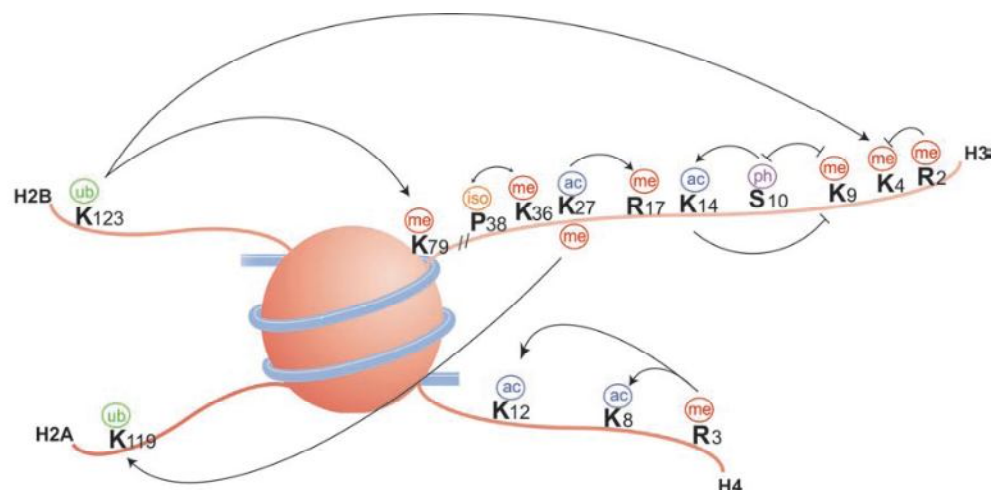
(I) Mezi modifikacemi může existovat kompetitivní antagonismus, pokud je více než jeden modifikační mechanismus cílen na stejné místo.<sup>33</sup> To platí zejména pro zbytky lysinů, které mohou být acetylovány či methylovány.<sup>31</sup>

(II) Jedna modifikace může být závislá na druhé. Dobrým příkladem této trans-regulace je methylace lysinových zbytků K4 a K79 histonu H3 (H3K4, H3K79) prostřednictvím methyltransferas COMPASS a Dot1, která je zcela závislá na ubiquitinylation lysinového zbytku K123 histonu H2B (H2BK123) prostřednictvím enzymů Rad6 a Bre1.<sup>34</sup>

(III) Vazba proteinu na konkrétní modifikaci může být narušena modifikací na vedlejším aminokyselinovém zbytku. Například protein HP1 se váže na histon H3, který je di- či trimethylovaný na lysinovém zbytku K9 (H3K9me2/3), ale při mitose je vazba narušena kvůli fosforylaci serinového zbytku S10 histonu H3 (H3S10).<sup>35</sup> Tento jev byl popsán jako tzv. "methylačně-fosforylační binární spínač". Pro vzájemný "cross-talk" se navíc modifikované aminokyseliny nutně nemusí nacházet přímo vedle sebe.<sup>36</sup>

(IV) Aktivita enzymu, který přímo či nepřímo katalyzuje reakce vedoucí ke změně posttranslačních modifikací, může být ovlivněna prostřednictvím modifikací jeho substrátu.<sup>31</sup> U kvasinek prolinová isomerasa Fpr4 katalyzuje vnitřní přeměnu peptidové vazby na prolinovém zbytku P38 histonu H3 (H3P38) a tato činnost ovlivňuje schopnost Set2 enzymu methylovat lysinový zbytek K36 histonu H3 (H3K36), který je spojený s genovou transkripcí.<sup>22,37</sup>

(V) Může existovat kooperace mezi modifikacemi zabezpečující účinné využití specifických faktorů. Například, "PHD finger protein 8" (PHF8) se specificky váže na trimethylovaný lysinový zbytek K4 histonu H3 (H3K4me3). Tato interakce je silnější, pokud na stejném konci tohoto histonu H3 jsou lysinové zbytky K9 a K14 acetylovány (H3K9/14).<sup>31</sup>



**Obrázek č. 3 - Schéma vzájemné komunikace (“cross-talk“) modifikací histonů:** Modifikace histonů se mohou vzájemně pozitivně nebo negativně ovlivňovat. Synergismus znázorňuje šipka a antagonismus úsečka. (Převzato z<sup>31</sup>)

### 1.3.1 Methylace histonů

Methylace histonů byla poprvé popsána v roce 1964 a dlouho patřila mezi méně studované posttranslační modifikace.<sup>38</sup> Nedávné studie však ukázaly, že methylace histonů je vzhledem ke své vysoké stabilitě jednou z nejdůležitějších posttranslačních modifikací, která hraje roli v přenosu epigenetické informace v průběhu buněčného dělení.<sup>39</sup> Histony jsou methylovány především na postranních řetězcích lysinu a argininu.<sup>40</sup> Zatímco lysinové zbytky mohou být methylovány do tří stupňů (mono-, di- nebo trimethylace), u argininových zbytků rozeznáváme pouze dva stupně methylace (mono- a dimethylace).<sup>31</sup>

Methylace histonů je spojena s transkripční aktivací či represí v závislosti na modifikovaném zbytku.<sup>39</sup> Trimethylace lysinových zbytků K4, K36 nebo K79 histonu H3 (H3K4/36/79) vede ke vzniku otevřené konfigurace chromatinu a je tedy charakteristická pro aktivní euchromatinové oblasti.<sup>41</sup> Naopak jako transkripční represory jsou popisovány trimethylace lysinových zbytků K9 a K27 histonu H3 (H3K9/27) a trimethylace lysinového zbytku K20 histonu H4 (H4K20) spojené s heterochromatinovým uspořádáním DNA.<sup>42</sup>

Methylaci histonů katalyzují tři různé skupiny proteinů: rodina specifických lysinových histonmethyltransferas (HMT) obsahující SET doménu (“Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax“), která modifikuje lysinové zbytky K4, K9, K27 a K36 histonu H3 (H3K4/9/27/36) a lysinový zbytek K20 histonu H4 (H4K20),<sup>43</sup> rodina



lysínových histonmethyltransferas neobsahující SET doménu se svým jediným zástupcem Dot1 (“disruptor of telomeric silencing1”), který modifikuje lysínový zbytek K79 histonu H3 (H3K79);<sup>40</sup> a rodina argininových methyltransferas (PRMT) modifikující argininové zbytky R2, R17 a R26 histonu H3 (H3R2/17/26) a argininový zbytek R3 histonu H4 (H4R3).<sup>35</sup>

V posledních letech byl význam methylace histonů zdůrazněn objevem histondemethylas. Doposud byly identifikovány dvě třídy lysínových histondemethylas (KDM): rodina LSD1/KDM1 obsahující aminoxidasovou doménu a rodina Jmjd2b obsahující doménu “jumonjiC” (jmc). Zatímco rodina LSD1/KDM1 demethyluje mono- a dimethylované histony na lysínových zbytcích K4 a K9 histonu H3 (H3K4/9), rodina Jmjd2b demethyluje di- a trimethylované lysínové zbytky K9, K27 a K36 histonů H3 (H3K9/27/36). Spojení demethylas a methyltransferas bylo prokázáno i na funkční úrovni.<sup>26,39</sup>

### 1.3.2 Fosforylace histonů

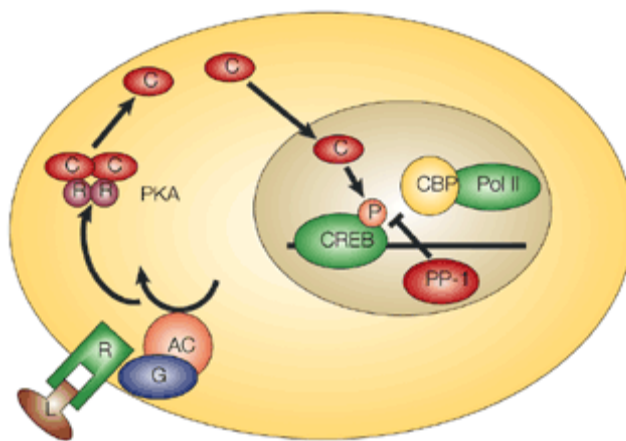
Ačkoliv byla fosforylace histonů objevena relativně brzy, stala se cílem intenzivního výzkumu teprve nedávno a není tedy o ní a jejím působení na genovou expresi mnoho známo.<sup>44</sup> Reverzibilní fosforylace histonů fosfatasami a kinasami bývá spojována s celou řadou buněčných procesů včetně replikace DNA, regulace transkripce, apoptosy, průběhu buněčného cyklu, buněčné odpovědi na stres a poškození DNA, kondenzace chromosomů a vývojové genové regulace.<sup>45</sup>

Ve většině případů je fosforylace serinových a threoninových zbytků jaderných histonů a histonů H1 spojena s kondenzací chromatinu během mitosy a meiosy, jako je tomu například v případě C-terminální fosforylace threoninového zbytku T119 histonu H2A (H2AT119) nebo fosforylace serinového zbytku S10 histonu H3 (H3S10).<sup>44</sup> Jiné studie potvrdily závislost fosforylace na buněčném cyklu, kdy byla nejvyšší hladina fosforylace histonů H1 a H3 popsána v jeho M-fázi.<sup>11</sup>

Hmotnostní spektrometrické analýzy lidského histonu H3 potvrdily, že fosforylace a methylace se během mitosy nacházejí na sousedních lysínových a serinových zbytcích K9, S10 a K27, S28 stejné molekuly histonu H3 (H3K9/S10 a H3K27/S28).<sup>44,45</sup> Tato skutečnost podporuje hypotézu tzv. “methylačně-fosforylačního binárního spínače”, podle které posttranslační modifikace na sousedních aminokyselinách

mohly modulovat vazbu efektorových molekul na histony.<sup>44,46</sup> Existuje několik studií potvrzujících existenci vzájemné komunikace “cross-talk“ mezi fosforylací a methylací aminokyselinových zbytků histonů v savčích buňkách.<sup>44,46</sup> Transkripčně neaktivní geny jsou obvykle přítomny v oblastech heterochromatinu, který je charakterizován přítomností heterochromatinového proteinu 1 (HP1) navázaného ke chromatinu prostřednictvím trimethylace lysinového zbytku K9 histonu H3 (H3K9me3).<sup>45</sup> Po zahájení mitosy je serinový zbytek S10 histonu H3 (H3S10) fosforylován a dochází k disociaci HP1 z chromosomů beze změn v hladinách trimethylace lysinového zbytku K9 histonu H3 (H3K9me3), zatímco fosforylace threoninového zbytku T11 histonu H3 (H3T11) potencuje demethylaci lysinového zbytku K9 histonu H3 (H3K9).<sup>26</sup>

Současné studie prokázaly, že stimulace epidermálním růstovým faktorem (EGF) vede v savčích buňkách k rychlé fosforylaci a acetylaci stejného terminálního konce histonu H3 v důsledku nukleosomální reakce.<sup>47</sup> Zvýšená fosforylace serinového zbytku S10 histonu H3 (H3S10) a threoninového zbytku T28 histonu H3 (H3T28) úzce souvisí s acylací lysinových zbytků K9 a K14 histonu H3 (H3K9/14) a je spojována s transkripční aktivací NFκB genů a protoonkogenů c-jun a c-fos.<sup>44</sup> Existuje však další synergismus fosforylace a acetylce histonů spojený se schopností fosforylace modifikovat proteiny nehistonové povahy a regulovat aktivity histonacetyltransferas (HAT) a histondeacetylasy (HDAC). Fosforylace serinového zbytku S133 proteinu vázajícího element responzivní pro cyklický AMP (CREB) katalyzovaná proteinkinasou A (PKA) podporuje jeho interakci s CREB-vazebným proteinem (CBP), který svou vnitřní HAT aktivitou a vazbou na RNA polymerasu II (Pol II) katalyzuje vstup buňky do S fáze buněčného cyklu (viz. Obrázek č. 4 na str. 19).<sup>47,48,49</sup> Genová aktivace je poté zakončena prostřednictvím defosforylace CREB katalyzované serin/threoninovými fosfatasami-1 (PP-1).<sup>50</sup> Fosforylace hraje důležitou úlohu také v signalizaci přechodu enzymů HDAC mezi jádrem a cytoplasmou.<sup>51</sup>



**Obrázek č. 4 - Schéma aktivace transkripce cílových genů spojené s fosforylací CREB:** Indukce adenylyl cyklasy (AC) aktivuje G protein (G). Růst hladiny buněčného cAMP vyvolá disociaci proteinkinasy A (PKA), která se skládá ze dvou párů regulačních (R) a katalytických (C) podjednotek. Volné C podjednotky migrují do nukleárního kompartmentu pasivní difúzí a fosforylují protein vázající CRE-element responzivní pro cAMP (CREB) v pozici serinu S133. Fosforylace S133 aktivuje transkripci navázáním CREB-vazebného proteinu (CBP). (Převzato z <sup>52</sup>)

### 1.3.3 Ubiquitinylace histonů

Ubiquitin je velmi konzervovaný protein složený ze 76 aminokyselin. Původně byl objeven jako makromolekulární značka, jejíž kovalentní připojení k určitému cílovému proteinu signalizuje jeho následný rozklad v proteasomu.<sup>53</sup> Navázání ubiquitinového peptidu na cílový protein katalyzují tři enzymy: ATP-dependentní ubiquitin-aktivující enzym (E1), střední ubiquitin-konjugující enzym (E2) a terminální ubiquitin-proteinová ligasa (E3).<sup>54</sup> Ubiquitin je nejprve aktivován ATP-dependentní reakcí zahrnující E1 a poté je konjugován přes thioesterovou vazbu na cysteinový zbytek v E2. V posledním kroku dochází k převedení ubiquitinu z E2 na cílový lysinový zbytek určitého proteinového substrátu pomocí E3. Zatímco polyubiquitinylace označuje proteiny pro degradaci v 26S proteasomu, monoubiquitinylace slouží pro signalizační účely a může být zvrácena působením thiolových ubiquitin-specifických proteas (USPS).<sup>55</sup>

Histony H2A a H2B jsou nejčastější proteiny ubiquitinylované v buněčném jádře.<sup>55</sup> Odhaduje se, že v buňkách obratlovců je konjugováno s ubiquitinem 5-15 % H2A a 1-2 % H2B, zatímco v kvasinkách je ubiquitinylovaných asi 10 % H2B. Dominantní formou ubiquitinylovaných histonů jsou monoubiquitinylované H2A a H2B (H2Aub a H2Bub) charakterizované jako vysoce konzervovaná lysinová residua s jedinou přidanou molekulou ubiquitinu. U savců byla pozorována ubiquitinylace lysinového zbytku K119

histonu H2A (H2AK119ub) a lysinového zbytku K120 histonu H2B (H2BK120ub).<sup>56</sup> Enzymy katalyzující H2B monoubiquitylaci jsou zapojeny do transkripční regulace svými pozitivními i negativními celkovými účinky na aktivitu genů.<sup>54</sup>

Dále byla pozorována ubiquitylace i u jaderných histonů H3, H4 a “linkerového” histonu H1. Biologická funkce těchto modifikací však nebyla doposud objasněna.<sup>55</sup> Tvorba K48-vázaných ubiquitinových řetězců orientuje histony do proteasomem zprostředkované degradace. Například při spermatogenezi jsou histony degradovány prostřednictvím tohoto mechanismu a nahrazeny transičními proteiny, které podporují kondenzaci chromatinu.<sup>56</sup>

Proteiny nehistonové povahy mohou též podléhat ubiquitylaci. Ubiquitin ligasa tímto způsobem kontroluje například funkci nádorového supresorového proteinu p53 a proteinu HIF-1 $\alpha$ .<sup>53</sup>

#### 1.3.4 ADP-ribosylace histonů

ADP-ribosylace je identifikována u méně než 1 % všech histonových proteinů. Jedná se o kovalentní posttranslační modifikaci, při které dochází k syntéze záporně nabitých polymerů ADP-ribosy na konkrétních akceptorových aminokyselinových zbytcích histonů.<sup>57</sup> Tato posttranslační modifikace byla doposud identifikována v N-terminální oblasti všech jaderných histonů H2A, H2B, H3 a H4,<sup>58</sup> lišila se však v závislosti na uspořádání chromatinu. Nejvyšší hladina ADP-ribosylace byla popsána u histonů H1 a H2B.<sup>59</sup>

Syntéza poly-ADP-ribosy je katalyzována ADP-ribosyltransferasami (ART) a vyžaduje NAD<sup>+</sup> jako substrát.<sup>59</sup> Rodina proteinů ART obsahuje 22 enzymů s ADP-ribosyltransferasovou doménou. Nejlépe charakterizovaná Poly(ADP-ribosylová) polymerasa 1 (PARP1) je nukleární multifunkční enzym o hmotnosti 113 kDa asociovaný s chromatinem, který se účastní procesů spojených s kontrolou transkripce, buněčnou diferenciací a regulací buněčného cyklu.<sup>58</sup> Zatímco katalytická doména PARP1 se nachází na jejím C-terminálním konci, N-terminální DNA-vazebné domény se podílí na vazbě různých forem nukleových kyselin.<sup>57,60</sup> Mezi koncové lysinové zbytky histonů, které mohou být modifikovány prostřednictvím PARP1, patří H2AK13, H2BK30, H3K27/37 a H4K16.<sup>57</sup> Na rozdíl od PARP1, PARP2 nemůže modifikovat jednotlivé histony *in vitro*.<sup>58</sup>

PARP3 interaguje s histony H2B a H3, ale není jasné, zda je sama schopna tyto histony modifikovat.<sup>60</sup>

### 1.3.5 SUMOylace histonů

Malé “ubiquitin-like“ modifikátory SUMO jsou proteiny příbuzné ubiquitinu, které jsou kovalentně konjugované s lysinovými zbytky cílových proteinů regulujících nejen replikaci a transkripci DNA, ale také progresi buněčného cyklu, genomovou stabilitu, intracelulární transport a segregaci chromosomů.<sup>61</sup> SUMO se ubiquitinu velmi podobá, oba proteiny dokonce zauímají podobnou 3D strukturu. Ubiquitin má však narozdíl od SUMO důležitou úlohu v degradaci proteinů.<sup>62</sup> SUMO a jeho ATP-závislá dráha substrátové konjugace jsou zachovány ve všech studovaných eukaryotních organismech.<sup>63</sup>

SUMO reverzibilně modifikuje mnoho proteinů, které jsou důležité pro regulaci genové exprese<sup>64</sup> včetně histonů, specifických promotorových transkripčních faktorů, transkripčních kofaktorů a enzymů modifikujících chromatin.<sup>65</sup> Bylo prokázáno, že SUMOylace stimuluje aktivitu faktoru tepelného šoku HSF1 a nádorového supresoru p53.<sup>64</sup> Nejčastěji však SUMOylace koreluje se sníženou transkripční aktivitou (např., Elk1, SP3, c-Myb a c-Jun) a tedy s potlačením cílových genů.<sup>62</sup>

SUMO konjugace je velmi dynamický proces, který může být rychle zvrácen působením rodiny Ubl (“ubiquitin-like“) specifických proteas (Ulp) u kvasinek a Sentrin specifických proteas (SENP) u savců.<sup>63</sup> Stejná rodina enzymů je také zodpovědná za dozrávání nově syntetizovaných SUMO před jejich první konjugací. SUMO jsou syntetizovány v podobě propeptidů, které před samotnou konjugací vyžadují sestřih pro odhalení C-terminálních diglycinových motivů. Konjugace vede k utvoření isopeptidové vazby mezi SUMO C-koncem a  $\epsilon$ -amino skupinou lysinu v cílovém proteinu.<sup>61</sup>

### 1.3.6 Deiminace a isomerace histonů

Argininová deiminace je posttranslační modifikace popsána především u histonů H3 a H4, která vede k přeměně argininu na citrulin. Tuto posttranslační modifikaci histonů

katalyzuje specifická argininová deiminasa PADI4, která deiminuje pouze arginin, který buď není nijak modifikovaný, nebo se nachází v monomethylované formě. Deiminace histonu H3 je považována za mechanismus inhibice transkripce zprostředkované methyloací argininu. Na methylované argininy tento deiminační enzym může efektivně působit jako arginin-specifická demethylasa.<sup>33</sup>

Prolinová isomerasa katalyzuje výměnu cis↔trans prolinových isomerů. V těchto dvou konformačních stavech se úhly mezi peptidovými vazbami připojujícími prolin k předchozí aminokyselině (X-P) vzájemně liší o 180°. V důsledku toho může prolinová isomerace výrazně ovlivnit sekundární strukturu polypeptidu. Prolinové isomerasy mohou být rozděleny do tří rodin: rodina Pin1, cyklofiliny a FK506 vazebné proteiny (FKBP). Jejich nejvýznamější zástupce Pin1 je regulátorem signálních drah spojených s transkripcí a progresí buněčného cyklu.<sup>37</sup>

## 1.4 Acetylace histonů

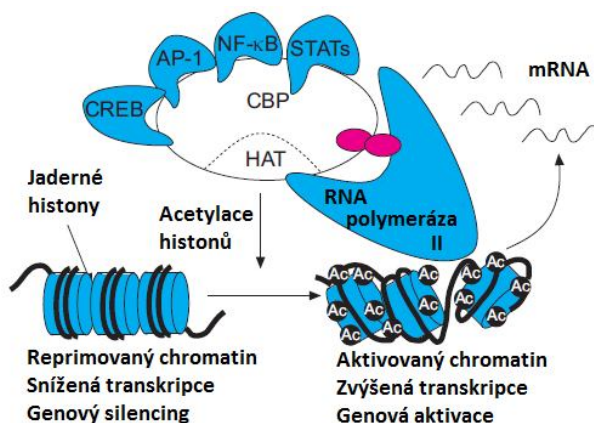
Acetylace lysinových zbytků na N-terminálních koncích histonů je vedle methylace hlavní posttranslační modifikací histonů. Mezi faktory, které regulují acetylaci histonů spojenou s aktivací transkripce respektive s umlčováním genů, opravami DNA či její rekombinací, patří enzymy histonacetyltransferasy (HAT) a histondeacetylasy (HDAC). Aktivita těchto enzymů úzce souvisí s koncentrací acetylCoA a NAD<sup>+</sup>, jejichž dostupnost a intracelulární lokalizace může určovat účinnost a specifičnost enzymatické reakce.<sup>66,67</sup>

Acetylace postranních zbytků aminokyselin (lysinů) vede ke změně náboje jádra histonu a k následné změně struktury chromatinu z uzavřené konformace na aktivní otevřenou formu,<sup>68</sup> která na sebe váže TATA box-binding protein (TBP), TBP-asociované faktory a RNA polymerasu II, jak je vidět na obrázku č. 5 na str. 23. Aktivované transkripční faktory následně interagují s velkými molekulami koaktivátorů s vnitřní HAT aktivitou, jako je CBP, P300 a PCAF ("P300/CBP-associated factor"). Ty působí jako molekulární přepínače ovládající genovou transkripci. Popsaný molekulární mechanismus je pravděpodobně společný pro všechny geny včetně těch zapojených do diferenciaci, proliferace a aktivace buněk.<sup>69,70</sup>

Na N-terminálních koncích jaderných histonů dochází k acetylaci lysinových zbytků K5 a K9 histonu H2A (H2AK5/9) a lysinových zbytků K5, K15 a K20 histonu H2B

(H2BK5/12/15/20).<sup>69</sup> Dále byla popsána acetylace lysinových zbytků K9, K14, K18 a K23 histonu H3 (H3K9/14/18/23) a lysinových zbytků K5, K8, K12 a K16 histonu H4 (H4K5/8/12/16).<sup>70</sup>

Acetylace histonů je dynamický proces, který může být zvrácen deacetylací jejich N-terminálních konců. Odstranění acetylových skupin prostřednictvím HDAC je spojeno se sbalením chromatinu, snížením genové exprese a transkripčním umlčením genů (“genový silencing”).<sup>69</sup>



**Obrázek č. 5 - Změna konformace chromatinu vlivem acetylace histonů:** Koaktivátor CBP má vnitřní HAT aktivitu, která vede k otevření chromatinové struktury umožňující vazbu RNA polymerasy II a k zahájení genové exprese. Několik transkripčních faktorů interaguje s CBP včetně CREB, nukleárního faktoru NF-κB, aktivátorového proteinu AP-1 a proteinů transdukce signálů a aktivátorů transkripce (STAT). (Upraveno a převzato z <sup>69</sup>)

### 1.4.1 Histonacetyltransferasy

Obecně rozlišujeme histonacetyltransferasy (HAT) typu A, které se nacházejí v buněčném jádře a histonacetyltransferasy typu B, které bývají lokalizovány v cytoplasmě. Některé histonacetyltransferasy se však mohou vyskytovat ve více komplexech nebo místech najednou a nemusí tedy vyhovovat této historické klasifikaci. Zatímco HAT typu A acetyluje nukleosomální histony v buněčném jádře a jsou potenciálně spojeny s transkripcí, HAT typu B acetyluje nově syntetizované volné histony a umožňují jejich dopravu z cytoplasmy do jádra, kde mohou být deacetylovány a začleněny do chromatinu.

Nejlépe popsaná skupina HAT je superrodina GNAT, jejíž zástupci jsou sekvenčně a strukturně podobní Gcn5 a regulují přijímání transkripčních faktorů na jejich cílových promotorech. Do této skupiny patří Gcn5 spolu se svými blízkými příbuznými

a tři vzdálenější příbuzní histonacetyltransferas: Hat1, Elp3, a Hpa2. Tato skupina také obsahuje řadu dalších eukaryotických a prokaryotických acetyltransferas využívajících různé substráty, což potvrzuje zachování tohoto typu acetylačního mechanismu v průběhu evoluce. HAT této rodiny obsahují čtyři sekvenční motivy A, B, C a D, jejichž funkce doposud není zcela známa a segment Arg/Gln-XX-Gly-X-Gly/Ala, který je spojen s rozpoznáním a navázáním substrátu acetyl-CoA.<sup>71</sup>

Další skupinou evolučně příbuzných proteinů je rodina Myst pojmenovaná po jejích nejvýznamnějších členech: MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, a Tip60. Tyto proteiny jsou seskupeny na základě vzájemných sekvenčních podobností a obsahu acetyltransferasové homologní oblasti (část motivu z rodiny GNAT). Členové Myst rodiny se podílejí například na regulaci mnoha DNA-zprostředkovaných reakcí, jako je replikace, promotorem řízená transkripční regulace, celochromosomální genová regulace a oprava dvojvláknových zlomů DNA.<sup>71,72</sup> Do skupiny ostatních HAT se řadí P300/CBP, který je všudypřítomným regulátorem genové transkripce a má obecně vysokou specifitu k proteinům histonové povahy; CCG1 (TAFII250/TAF1), který tvoří podjednotku obecného transkripčního iniciačního faktoru TFIID; a jaderné hormony SRC1 a ACTR (SRC3) regulované prostřednictvím HAT.<sup>72</sup>

### 1.4.2 Histondeacetylasy

Histondeacetylasy hrají důležitou roli v potlačení exprese genů prostřednictvím zvratu hyperacetylace jaderných histonů. Doposud bylo v savcích buňkách objeveno jedenáct HDAC, které se dělí do čtyř hlavních skupin. Třída I zahrnuje HDAC 1, HDAC 2, HDAC 3 a HDAC 8, které mají značnou homologii s kvasinkovým proteinem RPD3 a jsou lokalizovány převážně v jádře. Třída II obsahuje HDAC 4, HDAC 5, HDAC 6, HDAC 7, HDAC 9 a HDAC 10, které jsou homologní ke kvasinkovým “Hda-1-like“ enzymům a zajišťují transport acylové skupiny mezi jádrem a cytoplasmou. Zatímco enzymy třídy I jsou vysoce exprimovány a nacházejí se ve většině typů buněk, enzymy třídy II mají omezenou distribuci a mohou být zapojeny do buněčné diferenciace.<sup>69</sup>

Třída III histondeacetylasy je tvořena NAD<sup>+</sup>-závislými sirtuiny (SIRT). Tyto proteiny deacetylují nehistonové bílkoviny a pravděpodobně hrají roli v programované buněčné smrti mononukleárních buněk. U savců je tato třída složena ze sedmi členů (SIRT1 až SIRT7) s výraznou subcelulární lokalizací. Ačkoliv jsou sirtuiny spojovány



s regulací mitochondriálního energetického metabolismu, záněty, stárnutím a nádory, jejich přesná funkce zůstává nejasná. Kromě výše uvedených tří tříd HDAC vyšší eukaryota exprimují Zn-dependentní histondeacetylasy HDAC 11, která byla zařazena do samostatné třídy IV.<sup>66</sup>

Některé histondeacetylasy mohou deacetylovat též proteiny nehistonové povahy jako například  $\alpha$ -tubulin, protein p53, p65 a MyoD. Existují důkazy o tom, že jednotlivé HDAC jsou cíleny na odlišné typy acetylace a mohou tak regulovat různé geny. Regulace jednotlivých HDAC se také pravděpodobně liší. HDAC komunikují s korepresorovými molekulami, jako je jaderný receptorový korepresor, ligand-závislý korepresor NuRD nebo mSin3, z nichž všechny podporují HDAC v genové represi a mohou poskytovat specifitu výběrem genů umlčených prostřednictvím HDAC.<sup>69</sup>

## 1.5 Neuroblastom

Neuroblastom je nejčastější extrakraniální solidní nádor dětí, který tvoří přibližně 8 - 10 % všech pediatrických nádorových onemocnění a je příčinou přibližně 15 % dětských úmrtí způsobených zhoubnými nádory.<sup>73</sup> Průměrný věk pacientů v době diagnózy tohoto nádorového onemocnění je 18 měsíců, přičemž 40 % neuroblastomů je diagnostikováno v prvním roce života, 75 % do čtvrtého roku života a 98 % do desátého roku života dítěte. Velmi vzácně bývá neuroblastom diagnostikován u dospívajících a dospělých jedinců. Odlišné projevy tohoto nádorového onemocnění jsou spojovány s věkem. Pacienti mladší 12ti měsíců mají obecně lepší prognózu a to bez závislosti na velikosti a lokalizaci nádoru.<sup>74,75,76,77</sup>

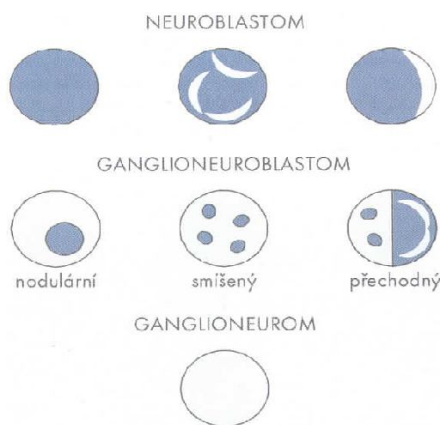
Neuroblastomy patří mezi značně heterogenní nádorová onemocnění vzhledem k široké škále svých klinických projevů od spontánní regrese a diferenciaci v benigní ganglioneuromy, až po rychlá a agresivní smrtelná maligní onemocnění.<sup>78</sup>

### 1.5.1 Biologie a klinický obraz neuroblastomu

Buňky neurální lišty procházejí v průběhu embryogeneze buněčnou diferenciací. U pacientů s neuroblastomem migrují a osídlují dřev nadledvin, sympatická ganglia a paraganglia. Tomu také odpovídá nejčastější lokalizace neuroblastomu v oblasti

nadledvin a paravertebrálních sympatických ganglií.<sup>78,79</sup> Primární nádor je nejčastěji lokalizován v břišní dutině (70 %), hrudníku (zadní mediastinum) a krku (25 %) nebo pánvi (5 %). Zhruba u 10-15 % nemocných prorůstá nádor do páteřního kanálu a v různém rozsahu stlačuje míchu. Jen u 40 % pacientů je onemocnění v době diagnózy lokalizované. U 60 % pacientů s neuroblastomem, bez ohledu na věk, jsou detekována metastatická ložiska.<sup>79</sup> Nejčastěji jsou metastázy nalezeny v kostech, játrech, lymfatických uzlinách a kůži. V mozku a plicích je výskyt metastáz velmi vzácný.<sup>75</sup>

Neuroblastom je obecně charakterizován jako nediferenciovaný nádor složený z malých uniformních kulatých buněk, tzv. neuroblastů. Do skupiny neuroblastomů patří také nádory s částečnou histologickou diferenciací, které jsou nazývány ganglioneuroblastomy.<sup>77,78,80</sup> Ty obsahují vedle různého procenta primitivních nediferenciovaných neuroblastomů též zralé gangliové buňky. Podíl jednotlivých celulárních složek a stromatu je základem subklasifikace neuroblastomů na nodulární, smíšené a přechodné, jak je schematicky uvedeno na obrázku č. 6.<sup>79</sup> Nejvíce diferenciovaný z celé škály neuroblastomů je ganglioneurom, který je benigní povahy a je tvořen pouze shluky dospělých diferenciovaných neuronových buněk obklopených hustým stromatem Schwannových buněk.<sup>77,80</sup>



**Obrázek č. 6 - Schematické znázornění různě diferenciovaných neuroblastomových nádorů:** Tmavé oblasti představují nediferenciované neuroblastomové části, světlé oblasti diferenciované ganglioneuromové části (Převzato z <sup>79</sup>)

Vzhledem k vysoké buněčné heterogenitě tohoto nádorového onemocnění mohou být lidské neuroblastomové buněčné linie rozděleny do tří základních buněčných

fenotypových skupin se vzájemně odlišnou morfologií a chováním.<sup>81</sup> V neuroblastomu jsou nejčastěji zastoupeny neuroblastické neuroendokrinní prekursorové tvořené malými kulatými buňkami s krátkými neuritickými výrůstky (N-typ).<sup>82</sup> Zastoupena je však také skupina velkých zploštělých buněk podobajících se „Schwannovým“ melanoblastomovým prekursorům neurální lišty, které pevně adherují k substrátu a vykazují kontaktní inhibici v buněčném růstu (S-typ).<sup>83</sup> Na pomezí obou buněčných fenotypů z hlediska vlastností a morfologie stojí intermediální kmenové buňky popisované jako malé zploštělé mírně přilnavé buňky s možnou přítomností neuritických výrůstků označované jako I-typ, jejichž diferenciaci mohou vznikat buňky S- i N-typu.<sup>82</sup>

Tyto tři fenotypové varianty, které jsou charakteristické pro většinu lidských buněčných linií neuroblastomu, vykazují různý tumorigenní potenciál. Zatímco buňky S-typu jsou neinvazivní a nevykazují tedy v měkkém agaru téměř žádné známky nekontrolovaného růstu, buňky N-typu tvoří pomalu rostoucí nádory s vyšší nádorovou účinností než buňky S-typu. Překvapivé je, že ze tří fenotypů mají nejvyšší tumorigenní kapacitu a efektivitu růstu buňky I-typu.<sup>84</sup>

Etiologie neuroblastomu doposud zůstává neznámá. Toto nádorové onemocnění však může být spojeno s dalšími poruchami neurálního rozvoje, jako je neurofibromatosa typu 1, Hirschsprungova nemoc, a příležitostně i s Beckwith-Wiedemannovým syndromem.<sup>85</sup> Sekvenací genomu byl zjištěn možný hereditární výskyt neuroblastomů.<sup>77</sup> Téměř v 80 % případů bývá u pacientů vysokého rizika prokázána ztráta heterozygosity (LOH) na 1. chromosomu,<sup>79</sup> byl však popsán také vzácný familiární autosomálně dominantní výskyt neuroblastomu spojený s mutací genu anaplastické lymfomové kinasy (ALK)<sup>86</sup>, genu „paired-like homeobox 2B“ (PHOX2B)<sup>87</sup> a genu kódujícího kinesin (KIF1B).<sup>88</sup> V patogenezi se uvažuje o vlivu chemických faktorů, konkrétně o vlivu některých toxických látek, kterým jsou ženy vystaveny během těhotenství. Jedná se především o látky obsažené v tabákovém kouři, marihuaně či alkoholických nápojích. Není vyloučen ani vliv těžkých kovů, které se vyskytují například v barvách na vlasy.<sup>77,79</sup>

### 1.5.2 Staging neuroblastomu

Rostoucí množství faktorů, které ovlivňují prognosu tohoto nádorového onemocnění, postupně vedlo ke změnám při plánování vhodné léčby a k vytvoření schématu rizikového rozdělení neuroblastomů, který zohledňuje jednotlivé skupiny

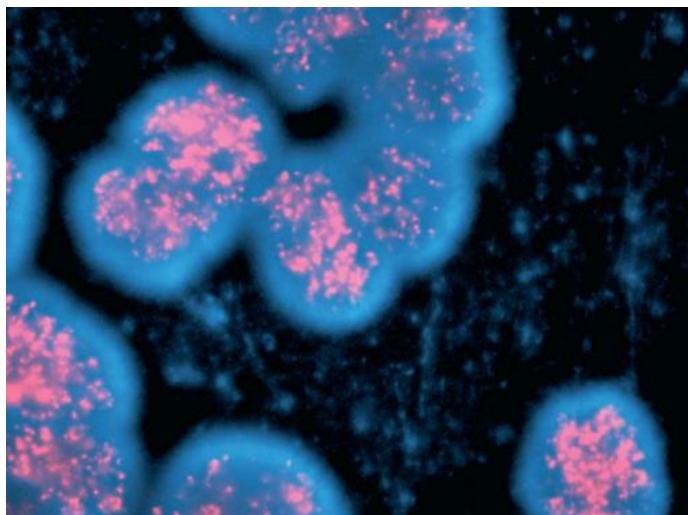
pacientů.<sup>74</sup> V roce 1986 byla vytvořena nová klasifikace neuroblastomů nazývaná International Neuroblastoma Staging System (INSS)<sup>89</sup> založená výhradně na určení rozsahu nádoru.<sup>87</sup> K poslednímu rozšíření došlo v roce 2008, kdy byl aktualizován stávající systém a navržen nový systém International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS) založený na klinických, histologických a biologických faktorech, ověřených v několika předchozích studiích. Toto kritérium diagnostiky a klinického hodnocení rozřazuje pacienty do skupiny nízkého, středního a vysokého rizika. Zohledňuje věk, stádium nádoru, N-myc amplifikaci, histologii dle Shimada a kol. a DNA ploidii. Přehledně je klasifikace neuroblastomů uvedena v tabulce č. 1.<sup>75</sup>

International Neuroblastoma Risk Group Staging System						
STÁDIUM	VĚK	N-Myc	PLOIDIE	HISTOLOGIE	JINÉ	RIZIKO
I						Nízké
IIA/IIB		Neamplifikovaný			> 50% resekce	Nízké
		Neamplifikovaný			< 50% resekce	Střední
		Neamplifikovaný			Pouze biopsie	Střední
		Amplifikovaný				Vysoké
III	< 547 dní	Neamplifikovaný		Příznivá		Střední
	≥ 547 dní	Neamplifikovaný				Střední
		Amplifikovaný				Vysoké
	≥ 547 dní	Neamplifikovaný		Nepříznivá		Vysoké
IV	< 365 dní	Amplifikovaný				Vysoké
	< 365 dní	Neamplifikovaný				Střední
	365-547 dní	Amplifikovaný				Vysoké
	365-547 dní		(DI) = 1			Vysoké
	365-547 dní			Nepříznivá		Vysoké
	365-547 dní	Neamplifikovaný	(DI) > 1	Příznivá		Střední
IVS	≥ 547 dní					Vysoké
	< 365 dní	Neamplifikovaný	(DI) > 1	Příznivá	Asymptomatický	Nízké
	< 365 dní	Neamplifikovaný	(DI) = 1			Střední
	< 365 dní	Chybí	Chybí	Chybí		Střední
	< 365 dní	Neamplifikovaný			Symptomatický	Střední
	< 365 dní	Neamplifikovaný		Nepříznivá		Střední
	< 365 dní	Amplifikovaný				Vysoké

**Tabulka č. 1 - Klasifikace neuroblastomového onemocnění** dle International Neuroblastoma Risk Group Staging System (Převzato a upraveno z <sup>75</sup>)

V patogenezi neuroblastomu hraje důležitou roli nespočet genetických změn, jakými jsou například aktivace onkogenů, přebytek či ztráta řady alel nebo změny v ploidii nádorových buněk. Jednou z nejdůležitějších genetických změn v genomu

neuroblastomových buněk je amplifikace N-Myc onkogenu. Ten je amplifikován přibližně u 17 - 20 % všech neuroblastomů, z nichž 30 - 40 % tvoří nádory vysokého rizika charakteristické svým velmi agresivním chováním. Konkrétní mechanismus, který vysvětluje tento nepříznivý transkripční fenotyp, není známý. V současnosti je přítomnost tohoto genu standardně prokazována u dětí s neuroblastomem pomocí celé řady molekulárních technik zahrnujících zejména Southern blot, fluorescenční hybridizaci in situ (FISH) (viz. Obrázek č. 7), kvantitativní PCR a imunocytochemické metody.<sup>90</sup>



**Obrázek č. 7 - Amplifikace onkogenu N-Myc detekovaná pomocí metody FISH:** Růžově je znázorněno zmnožení N-Myc kopií detekované v nádorových buňkách pomocí značené N-Myc sondy (Převzato z<sup>91</sup>)

Bylo zjištěno, že méně agresivní neuroblastomy mají mutace spojené se zmnožením nebo ztrátami celých chromosomů. To by mohlo vysvětlovat příznivou prognosu hyperdiploidních a triploidních neuroblastomů s výskytem u dětí mladších než 1 rok. Naopak diploidní a tetraploidní nádory detekované u starších dětí vedou k chromosomovým přestavbám, nevyváženým translokacím a obecně k horší prognose léčby. Nedávná analýza pacientů léčených na základě biologie nádorů ukazuje předpokládané 11-leté přežití 94 % pacientů s DNA indexem (DI) > 1 a 52 % pacientů s (DI) = 1.<sup>92</sup>

Postupně byly v různém rozsahu pozorovány delece na chromosomech 1p, 2q, 3p, 4p, 9p, 11q a 14q.<sup>9,92,93</sup> Delece krátkého raménka chromosomu 1 (del 1p) byla popsána asi ve 30 % všech neuroblastomových nádorových onemocnění. Tato změna je spojována s nevyváženou translokací dlouhého raménka chromosomu 17 a také s amplifikací

onkogenu N-Myc. Prognostický význam této delece byl po dlouhou dobu kontroverzní. Studie z poslední doby však ukazují, že se jedná o nezávislý prediktivní faktor pro časnou progresi choroby, který nemá vliv na délku celkového přežití onemocnění neuroblastomem.<sup>92</sup> Dále, v 15 – 44 % všech neuroblastomů bývá pozorována ztráta alel na chromosomu 11, která je spojována se špatnými klinickými výsledky.<sup>93</sup>

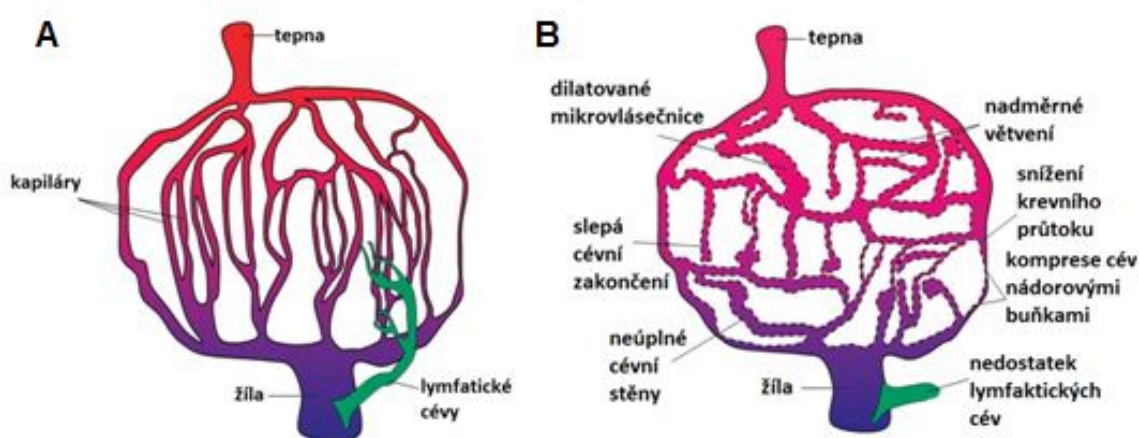
Zmnožení genetického materiálu na dlouhém raménku chromosomu 17 (tzv. "17q gain") vyplývající z nevyvážené translokace s chromosomem 1p nebo 11q je sledována až u 80 % neuroblastomů. Toto zmnožení je spojováno s pokročilými a prognosticky nepříznivými onemocněními. Naopak zmnožení celého chromosomu 17 je sledováno u triploidních nádorových onemocnění s příznivými klinickými výsledky. Místa poškození chromosomu 17 jsou variabilní, což naznačuje více genů zapojených do vývoje nádorového onemocnění.<sup>9</sup>

Faktory, které jsou odpovědné za maligní transformaci, při které dochází k přeměně neuroblastů v buňky vysoce maligního neuroblastomu, nejsou doposud zcela objasněny. S velkou pravděpodobností jsou však tyto děje ovlivňovány drahami s neurotrofinovými receptory, které vedou k buněčné diferenciaci. Hlavními ligandy těchto tyrosin-kinasových receptorů TrkA, TrkB a TrkC (též známých jako NTRK3), jsou nervový růstový faktor (NGF), mozkový neurotrofinní faktor (BDNF) a neurotrofin-3 (NT-3). Vazba NGF na receptor TrkA aktivuje jeho autofosforylaci a následně indukci genové transkripce.<sup>77</sup>

Aktivace těchto specifických signálních drah je spojována s přežitím buněk nebo jejich diferenciací, zatímco inhibice TrkA receptoru může vést k programované buněčné smrti závislé na stádiu diferenciaci buňky. Vysoká exprese TrkA receptoru je charakteristická především pro prognosticky příznivá onemocnění mladších dětí a kojenců a také pro nízká klinická stadia onemocnění při absenci N-Myc amplifikace. Vysoká exprese receptoru TrkB je naopak hodnocena jako prognosticky nepříznivý faktor. Autokrinní stimulace, která vzniká vazbou faktoru BDNF na receptor TrkB, podporuje navíc aktivně angiogenezi a je zodpovědná v určité míře i za lékovou rezistenci neuroblastomu. Exprese receptoru TrkC je popsána zejména u nižších stádií onemocnění bez amplifikace N-Myc onkogenu. Na rozdíl od TrkB je TrkC specifický pro prognosticky příznivá onemocnění.<sup>77,94</sup>

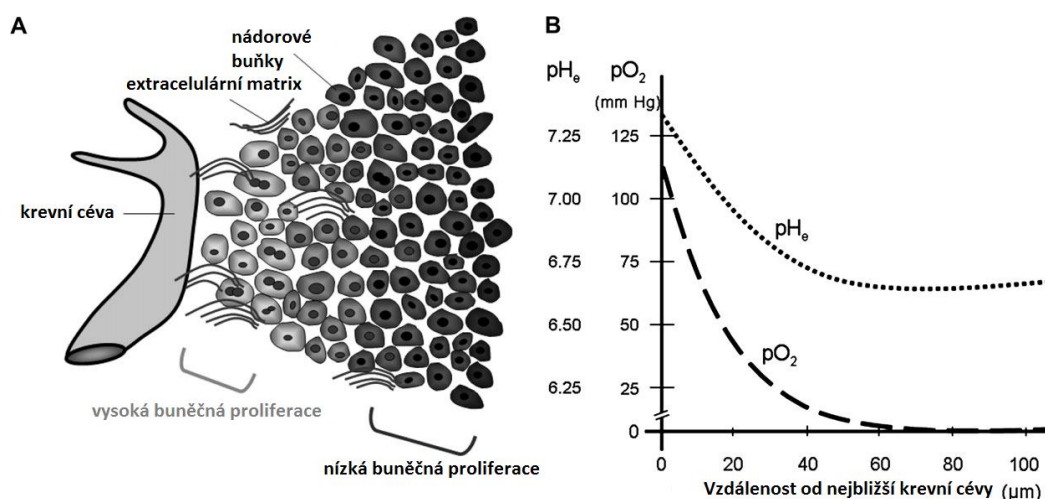
## 1.6 Nedostatečné zásobení tkání kyslíkem

Buňky, tkáně a organismy se dostávají do stavů nízkého parciálního tlaku kyslíku ( $pO_2 < 30 \text{ mm Hg}$ ,  $0\text{--}3 \% O_2$ ) nazývaných “hypoxie“ za fyziologických i patologických podmínek.<sup>95</sup> V porovnání s normální zdravou tkání je nádorová tkáň zásobena kyslíkem neadekvátně.<sup>96</sup> Jak lze vidět na obrázku č. 8, v prolifерující nádorovém ložisku se vytváří nedostatečné a špatně organizované cévní zásobení charakterizované nepravidelným a pomalým průtokem krve.<sup>97</sup>



**Obrázek č. 8 - Uspořádání cévního systému: A) v normální zdravé tkáni, B) v solidním nádoru.** Červeně je znázorněna kyslíkem dobře zásobená krev v tepnách, modře je znázorněna nedostatečně kyslíkem zásobená žilní krev, zeleně jsou znázorněny lymfatické cévy (Převzato a upraveno z <sup>97</sup>)

Cévy nádorů postrádají hierarchické uspořádání cévního řečiště do arteriol, kapilár a drobných žil. Jsou často dilatované a stočené a oproti normálním tkáním mají větvený charakter s nadbytečnými smyčkami a arteriovenosními aneurysmaty.<sup>95,96</sup> Stěny nádorových cév mohou obsahovat nesouvislé nebo chybějící bazální membrány a menší množství pericytů než stěny běžných cév.<sup>97</sup> Vzhledem k nehomogennímu cévnímu systému dochází v nádorové tkáni ke snížení zásobení buněk živinami. Dochází také ke snížení glomerulární filtrace rozkladných produktů metabolismu, což způsobuje tvorbu hypoxických a acidických oblastí uvnitř nádorů (viz. Obrázek č. 9 na str. 32).<sup>97</sup>



**Obrázek č. 9 - Mikroprostředí nádoru ve vztahu ke krevním cévám: A)** Proliferace nádorových buněk a extracelulární matrix (ECM) v závislosti na vzdálenosti od krevní cévy. **B)** Závislost gradientu koncentrace kyslíku  $pO_2$  (čárkovaná křivka) a pH (tečkovaná křivka) na vzdálenosti od nádorové krevní cévy (Převzato a upraveno z <sup>97</sup>).

### 1.6.1 Adaptace buněk na nedostatek kyslíku

Přibližně 1 - 5 % celého genomu je transkripčně regulováno v důsledku nedostatku  $O_2$ .<sup>98</sup> Transkripční odpověď na sníženou dostupnost  $O_2$  na úrovni buněk a celého organismu je primárně zprostředkována dvěma hypoxií indukovatelnými faktory, HIF-1 $\alpha$  a HIF-2 $\alpha$ .<sup>95</sup> Jejich vzájemná dimerizace je následována vazbou vzniklého komplexu na úseky DNA, které odpovídají genům nezbytným pro adaptaci buněk na hypoxii a aktivují jejich transkripci.<sup>99</sup> Tyto geny jsou zapojeny do mnoha různých biologických procesů na tkáňové úrovni, jakými jsou například erytropoéza, angiogeneze, proliferace, energetický metabolismus či apoptosa.<sup>98,95,100</sup>

Klíčovou odpovědí na chronickou hypoxii na buněčné úrovni je díky snížení tvorby ATP přechod z oxidativní fosforylace na anaerobní glykolýzu s nárůstem spotřeby glukosy a produkce laktátu. Vzhledem ke sníženému zásobování kyslíkem a živinami se v buňkách sníží aktivita  $Ca^{2+}$  kanálů a dojde ke zvýšení koncentrace  $Ca^{2+}$  iontů uvnitř mitochondrií. Omezí se nepodstatné energeticky náročné mechanismy a energie se použije například na udržování iontové homeostasy a membránového potenciálu nebo na zvýšení exprese stresových proteinů regulujících buněčnou smrt či přežití.<sup>98</sup>



Nedostatečné zásobení kyslíkem způsobené nehomogenitou cévního systému vyvolá rezistenci nádorů k léčbě chemoterapií a radioterapií. Nízké pH mikroprostředí nádorů způsobené vysokou hladinou laktátu může inhibovat aktivní transport slabě zásaditých léků do buňky.<sup>101</sup> Navíc se hypoxické buňky změnou na glykolytický metabolismus stávají odolnými k apoptose a mohou metastazovat.<sup>4</sup>

### 1.6.2 HIF transkripční faktory

Do rodiny transkripčních faktorů indukovatelných hypoxií (“hypoxia-inducible“ factor“, HIF) patří HIF-1, HIF-2 a HIF-3. Nejlépe prozkoumaným z nich je heterodimer HIF-1 skládající se z podjednotky alfa (HIF-1 $\alpha$ ) a podjednotky beta (HIF-1 $\beta$ ), známé také jako jaderný translokátor Ah receptoru (ARNT).<sup>102</sup> Obě podjednotky jsou základní “helix-loop-helix-Per-ARNT-Sim“ (bHLH-PAS) doménové proteiny. Vazby DNA a dimerizace jsou v nich zprostředkovány základními HLH doménami a doména PAS se podílí na tvorbě dimeru a transkripční domény (TAD).<sup>103</sup> Podjednotka HIF-1 $\alpha$  je cytoplasmatický protein citlivý na koncentraci kyslíku v buňce, který determinuje aktivitu proteinového komplexu HIF-1. HIF-1 $\beta$  je narozdíl od HIF-1 $\alpha$  jaderným proteinem, který je konstitutivně exprimován nezávisle na koncentraci kyslíku.<sup>101</sup>

Za aerobních podmínek je HIF-1 $\alpha$  obvykle velmi nestabilní a v buňce prakticky nedetekovatelný. Poločas jeho degradace je menší než 5 min.<sup>9, 98</sup> Hydroxylace prolinových zbytků 402 a 564 podjednotky HIF-1 $\alpha$  prostřednictvím prolylových hydroxylas závislých na kyslíku (PHD) umožňuje navázání “von Hippel – Lindau“ nádorového supresorového proteinu (pVHL). Rozpoznání HIF-1 $\alpha$  prostřednictvím pVHL je usnadněno acetylací lysinového zbytku 532 na kyslíku nezávislou acetyltransferasou ARD1.<sup>101</sup> Následně HIF-1 $\alpha$  interaguje s ubiquitin-E3 ligasou v cytosolu<sup>95</sup> a dochází k jeho degradaci prostřednictvím ubiquitin-proteasomového systému v 26S proteasomové dráze.<sup>96</sup>

Za hypoxických podmínek dochází kromě snížení aktivity prolylhydroxylasy (PHD) také k omezení hydroxylace prolinu, což má za následek snížení nebo úplné zastavení ubiquitinylace a degradace podjednotek HIF-1 $\alpha$ .<sup>102</sup> Ty z cytosolu přecházejí do jádra, kde heterodimerizují s podjednotkami HIF-1 $\beta$ . Vzniklý komplex je aktivní HIF-1 protein, který se váže na specifické HIF-responzivní oblasti DNA (“HIF-responsive elements“, HRE) přítomné v cílových genech a aktivuje jejich transkripci. Komplex HIF-1 reguluje v jádře více než 100 genů důležitých pro buněčnou proliferaci a apoptosu.<sup>4</sup>

### 1.6.3 Hypoxie a regulace transkripce

V adaptivní reakci na deprivaci  $O_2$  mění nádorové buňky expresi genů aktivací hypoxií indukovatelného faktoru HIF. Pro  $\alpha$  podjednotky HIF je typická kooperativní regulace genů zapojených do angiogeneze a metastázování. HIF-1 $\alpha$  však navíc selektivně aktivuje geny zapojené do glykolýzy a epigenetické regulace a HIF-2 $\alpha$  se podílí na stimulaci exprese transkripčních faktorů důležitých pro regulaci diferenciaci buněk, jako jsou Notch, Oct-4 a c-Myc.<sup>98</sup> Způsob, jakým HIF-2 $\alpha$  přispívá k aktivaci těchto transkripčních faktorů, doposud nebyl popsán. Společně údaje naznačují, že Oct-4 může zvyšovat expresi c-Myc regulací Notch signalizace. Vazbou HIF-2 $\alpha$  na Oct-4 v otevřené konfiguraci a dochází k indukci exprese tohoto proto-onkogenu. Exprimovaný HIF-2 $\alpha$  přímo interaguje s Myc-Myc proteinovým komplexem X (Max), čímž podporuje jeho stabilizaci a transkripční aktivaci.<sup>104</sup>

Geny rodiny Myc jsou v řadě lidských nádorů deregulovány. Zatímco c-Myc je exprimován ve většině z nich, exprese N-Myc je omezena pouze na nádory odvozené z nervového systému, jako je například neuroblastom.<sup>105</sup> V hypoxii dochází k inhibici aktivity onkogenu c-Myc zprostředkované HIF-1 $\alpha$ . Ta vede ke zvýšení exprese proteinů p21 a p27 a snížení exprese cyklinu D2 a transkripčního faktoru E2F1, které se projevují celkovým snížením proliferace buněk. V přímém kontrastu k HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  zvyšuje aktivitu c-Myc v buňkách odvozených od karcinomu ledvin (ccRCC) a jiných primárních nádorů.<sup>104</sup> V buňkách Burkittova lymfomu, ve kterých je c-Myc vysoce exprimován, však HIF-1 $\alpha$  s genem c-Myc ve skutečnosti spolupracuje, aby tak selektivně zvýšil expresi hexokinasy 2 (HK2), protein-dependentní kinasy 1 (PDK1) a vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF).<sup>104,105</sup>

Komunikace "cross-talk" mezi c-Myc a HIF drahami je obecně velmi složitá.<sup>105</sup> Specifické promotory cílových genů, typy buněk a hypoxické podmínky předurčují způsob, jakým HIF-1 $\alpha$  a HIF-2 $\alpha$  ovlivní c-Myc dráhu, čímž je dosaženo zvýšení či snížení exprese cílového genu, která se může podílet na vývoji nádorového onemocnění.<sup>104</sup>

## 2 Cíl diplomové práce

Nedostatek kyslíku, který je pro nádorové buňky typický, mění jejich expresní profil. Hypoxií stresované buňky spouští transkripci mnoha genů nutných pro jejich přežití a naopak zastavují produkci těch proteinů, které pro přežití těchto nepříznivých podmínek nezbytně nepotřebují. Uspořádání chromatinové struktury se tedy dynamicky dané situaci přizpůsobuje.

Cílem předkládané diplomové práce bylo:

- sledování změn v acetylaci histonů H3 a H4 neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-3, UKF-NB-4, SH-SY5Y a SK-N-AS, které mění uspořádání chromatinové struktury, po vystavení studovaných buněk 24h hypoxii
- měření aktivity histonacetyltransferas a histondeacetylas, tedy enzymů, které se samotné acetylace histonů účastní
- studium exprese proto-onkogenů N-Myc a c-Myc v závislosti na kultivačních podmínkách (normoxie versus 24h hypoxie).

### 3 Experimentální část

#### 3.1 Použitý materiál a chemikálie

##### **BIO-RAD (USA)**

sušené odtučněné mléko (“Blotting-Grade Blocker non-fat dry milk”), souprava pro stanovení koncentrace proteinů (“DC protein assay”), chemiluminiscenční souprava (“Immun-Star™ HRP Chemiluminescent Kit”), sekundární kozí protilátka s HRP konjugátem proti králičí IgG, sekundární kozí protilátka s HRP konjugátem proti myší IgG

##### **BioVision (USA)**

sada pro stanovení aktivity histonacetyltransferas (“HAT Activity Colorimetric Assay Kit”), sada pro stanovení aktivity histondeacetylasy (“HDAC Activity Colorimetric Assay Kit”), sada pro izolaci jaderné/cytosolární frakce (“Nuclear/Cytosol Fractionation Kit”)

##### **FOMA BOHEMIA (ČR)**

MEDIX XBU lékařský x-ray film

##### **Lachema (ČR)**

Tris (1,1,1-tris (hydroxymethyl) aminomethan

##### **Lach-Ner (ČR)**

chlorid draselný, chlorid hořečnatý

##### **Life Technologies (Kanada)**

dithiothreitol (DTT), elektroforetický standard složený z rekombinantních prokaryotických

proteinů (“SeeBlue® Plus 2 Prestained Standard“), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonová kyselina (HEPES), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), L-glutamin, sodný fosfátový pufr s obsahem NaCl (PBS), 0,25% trypsin

**Linde (ČR)**

kalibrační plyn (O<sub>2</sub> 1%, CO<sub>2</sub> 5%, N<sub>2</sub> zbytek), medicínální CO<sub>2</sub>

**Lonza (USA)**

“Iscove’s modified Dulbecco’s“ médium (IMDM) s glutaminem, blotovací pufr (“ProSieve™ EX transfer buffer“)

**PAA (Rakousko)**

fetální hovězí sérum (FBS), “Iscove’s modified Dulbecco’s“ médium (IMDM) bez glutaminu

**Penta (ČR)**

hydrogenuhlíčitan sodný, kyselina chlorovodíková, kyselina octová, methylalkohol

**Roche (Německo)**

proteasový inhibitor (“Complete™ Protease Inhibitor Cocktail“), histonový standard z telecího brzlíku (“Calf thymus histones“)

<b>Santa Cruz Biotech. (USA)</b>	primární polyklonální králičí protilátka anti-acetyl-H3 a anti-acetyl-H4, primární monoklonální králičí protilátka anti-c-Myc, primární monoklonální myší protilátka anti-N-Myc
----------------------------------	---

<b>Sigma (USA)</b>	1,2-bis (dimethylamino)ethan, 40% AA mix (akrylamid/bis-akrylamid = 29/1), peroxodisíran amonný (APS), butyrát sodný, glycin, IGEPAL®CA-630, primární myší protilátka anti-aktin, deoxycholát sodný, dodecylsulfát sodný (SDS), (1,2bis(dimethylamino)ethan)(TEMED), (polyoxyethylen-sorbitanmonolaurát)(TWEEN 20), Ponceau S
--------------------	---

Všechny používané chemikálie (kyseliny, hydroxidy, soli a organická rozpouštědla) byly čistoty p.a. či lepší.

Lidské neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS (S-typ), SH-SY5Y (N-typ) a lidská buněčná linie A549 odvozená z alveolárního plicního karcinomu byly zakoupeny od firmy ATCC (USA).

Lidské neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3 (N-typ) a UKF-NB-4 (S-typ) byly darem pana profesora Jindřicha Činátla, DrSc. (Goetheho Univerzita ve Frankfurtu, Frankfurt nad Mohanem, Německo).

### 3.2 Přístroje

Snímky buněčných linií byly pořízeny fotoaparátem Olympus C-5050 připojeným k mikroskopu Olympus IX51 (Česká republika).

Destilovaná voda MilliQ používaná pro experimenty byla upravována přístrojem Millipore Direct – Q3 UV, Millipore (USA).

### **3.3 Metody**

#### **3.3.1 Rozmrazení buněk**

Buněčné suspenze uskladněné v kryozkumavkách v tekutém dusíku při teplotě  $-196^{\circ}\text{C}$  byly rozmrazeny ve vodní lázni ( $37^{\circ}\text{C}$ , 2 min) a přeneseny do uzavíratelné centrifugační zkumavky (15 ml) se 2 - 3 ml kompletního kultivačního média. Následně byla provedena centrifugace při 1250 rpm po dobu 2 minut při pokojové teplotě v centrifuze UNIVERSAL 320, Hettich (Německo). Supernatant byl odstraněn a peleta buněk byla jemně resuspendována v 10 ml kultivačního média. Buněčná suspenze byla přenesena do kultivační lahve ( $25\text{ cm}^2$ ) a buňky byly pěstovány v inkubátoru Jouan IGO 150 (Francie) při  $37^{\circ}\text{C}$  v normoxii ( $\text{O}_2$  21 %,  $\text{CO}_2$  5 %, vlhkost vzduchu 95 %).

#### **3.3.2 Kultivace buněk**

Lidské neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS, SH-SY5Y, UKF-NB-3 a UKF-NB-4 a lidská buněčná linie A549 odvozená z alveolárního plicního karcinomu byly kultivovány v Iscove's Modified Dulbecco's médiu (IMDM) doplněném 10% fetálním hovězím sérem (FBS) a 1% L-glutaminem (v případě IMDM bez glutaminu). Buněčná linie A549 byla také kultivována v Gibco® Ham's F12 Nutrient Mixture médiu (F12) s přísadkou 10% fetálního hovězího séra (FBS) a 1% L-glutaminu.<sup>10</sup> Vzhledem k tomu, že nebyly zjištěny výrazné změny při kultivaci buněčné linie A549 v IMDM a F12 médiu, bylo dále používáno IMDM médium pro kultivaci všech buněčných linií.

Kultivace probíhala při  $37^{\circ}\text{C}$  v inkubátoru Jouan IGO 150 (Francie) v normoxii ( $\text{O}_2$  21 %,  $\text{CO}_2$  5 %, vlhkost vzduchu 95 %) a v hypoxii v komůrce C-Chamber Proox model C21, Biospherix (USA) ( $\text{O}_2$  1 %,  $\text{CO}_2$  5 %,  $\text{N}_2$  94 %) v kultivačních lahvích ( $75\text{ cm}^2$ ) nebo na kultivačních miskách ( $60\text{ cm}^2$ ).

### 3.3.3 Pasážování buněk

Pasážování buněčných linií bylo prováděno v pravidelných intervalech (1x až 2x týdně). Všechny chemikálie byly před použitím temperovány na 37°C. Růst buněk byl ověřován mikroskopem Olympus IX51 (Česká republika), a pasážování bylo optimálně prováděno při 70% pokrytí kultivační plochy. Nejprve bylo odstraněno kultivační médium a dno kultivační lahve bylo 2x opláchnuto roztokem PBS pro odstranění neadherovaných buněk a zbytků média s obsahem FBS. Adherované buňky byly z povrchu kultivačních nádob uvolňovány 0,25% roztokem trypsinu v PBS (suchá trypsinace 2–4 minuty při teplotě 37°C) a část buněčné suspenze byla resuspendována v potřebném množství kultivačního média (10–15 ml pro kultivační plochu 25 cm<sup>2</sup>, 20–25 ml pro kultivační plochu 75 cm<sup>2</sup>). Buňky byly dále pěstovány při 37°C v inkubátoru Jouan IGO 150 (Francie) v normoxii (O<sub>2</sub> 21 %, CO<sub>2</sub> 5 %, vlhkost vzduchu 95 %) a v hypoxii v komůrce C-Chamber Proox model C21, Biospherix (USA) (O<sub>2</sub> 1 %, CO<sub>2</sub> 5 %, N<sub>2</sub> 94 %).

### 3.3.4 Počítání buněk

Před zahájením experimentu bylo vždy nutné buňky spočítat. Po provedení trypsinace a resuspendování buněk v 1 ml kultivačního média bylo odebráno 0,1 ml buněčné suspenze, které bylo následně zředěno roztokem PBS. Buňky byly počítány v Bürkerově komůrce za použití mikroskopu Olympus IX51 (Česká republika).

$$\text{počet/1 ml média} = \text{počet buněk ve 24 čtvercích Bürkerovy komůrky} \times \text{ředění} \times 10^4$$

Počáteční množství buněk určené pro experimenty se lišilo v závislosti na celkové délce expozice normoxickým/hypoxickým podmínkám a na velikosti buněk dané buněčné linie. Pro expozici 24 hodin v normoxii/hypoxii byla stanovena jako optimální tato počáteční množství buněk:

SK-N-AS: ~ 40 000 buněk/cm<sup>2</sup>

SH-SY5Y: ~ 41 000 buněk/cm<sup>2</sup>

UKF-NB-3: ~ 83 000 buněk/cm<sup>2</sup>

UKF-NB-4: ~ 42 000 buněk/cm<sup>2</sup>

A549: ~ 41 000 buněk/cm<sup>2</sup>



### 3.3.5 Sklizení buněk

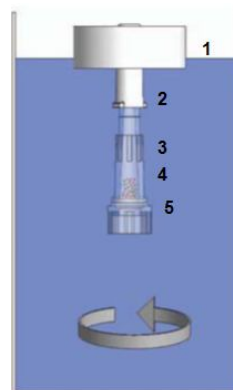
Pomocí kultivační škrabky byly buňky odstraněny z povrchu kultivační misky. Buněčná suspenze byla pipetou přenesena do centrifugační zkumavky. Byla provedena centrifugace při 2500 rpm po dobu 2 minut při pokojové teplotě na centrifuze UNIVERSAL 320, Hettich (Německo). Buňky byly promyty 1 ml PBS a opět centrifugovány při 2500 rpm po dobu 2 minut při pokojové teplotě. Po zopakování promytí 1 ml PBS byla směs přenesena do mikrozukmavek eppendorf a centrifugována za stejných podmínek. Peleta s buňkami byla skladována v mikrozukmavce v mrazícím boxu při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.6 Kyselá extrakce s následnou dialýzou

Kyselá extrakce s následnou dialýzou byla provedena dle postupu popsaného v pracovním listě k protilátce H4 (Lot#29867) od firmy Upstate.<sup>106</sup> Buněčná směs, která byla uchovávána v mrazícím boxu při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$  (viz. kapitola 3.3.5 na str. 41), byla resuspendována ve dvojnásobném množství lyzačního pufru, než byl její původní objem (složení: 10mM HEPES; 1,5mM  $\text{MgCl}_2$ ; 10mM KCl; 0,5mM DTT; 1,5mM PMSF). Následně byla do roztoku přidána HCl tak, aby ve výsledném objemu byla její koncentrace 0,2M. Zkumavky byly několikrát obráceny dnem vzhůru pro důkladné promíchání a inkubovány na ledu po dobu 30 minut. Následně byla provedena centrifugace při  $4^{\circ}\text{C}$  a 11 000 g po dobu 10 minut na centrifuze Centrifuge 5415 R, Eppendorf (Německo). Supernatanty byly nejprve dialyzovány v dialyzačních mikrozukmavkách Harvard Apparatus (USA) (viz. Obrázek č. 10), 2x1 hodinu proti 0,1M kyselině octové a poté 1x2 hodiny proti ddH<sub>2</sub>O. Následně byly vzorky dialyzovány přes noc opět proti ddH<sub>2</sub>O. Druhý den byly vzorky převedeny do zkumavek eppendorf, ve kterých byly uchovány v mrazícím boxu při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$  pro další použití.

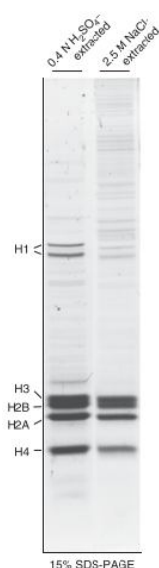
**Obrázek č. 10 - Dialyzační mikrozukmavka:**

1 - Plovák, 2 - Čepička, 3 - Dialyzér, 4 - Vzorek, 5 - Membrána (Převzato z<sup>107</sup>)



### 3.3.7 Kyselá extrakce s následným srážením TCA

Kyselá extrakce histonů s následným srážením trichloroctovou kyselinou (TCA) byla provedena dle studie D. Shechter a kol. z r. 2007, která doporučuje tuto metodu jako postup pro izolaci čisté frakce obsahující histony.<sup>108</sup> V prvním kroku byly buňky lyzovány za hypotonických podmínek. Buněčná jádra jsou oddělena a extrahována v kyselém prostředí pro selektivní izolaci histonů, které jsou podrobeny další analýze prostřednictvím SDS-PAGE a imunoblottingu (viz. Obrázek č. 11).



**Obrázek č. 11 - SDS gel obarvený Coomassie Brilliant Blue s kyselé extrahovanými histony (Převzato z <sup>108</sup>)**

Buněčná peleta, která byla uchovávána v mrazícím boxu při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$  byla resuspendována v 1 ml hypotonického lyzačního pufru (složení: 10mM Tris-Cl pH 8; 1mM KCl; 1,5mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1mM DTT), který obsahoval proteasový inhibitor Complete™ Protease Inhibitor Cocktail ředěný v poměru 1/25. Směs byla přenesena do nové zkumavky eppendorf a inkubována na otočném stojanu v lednici po dobu 30 minut. Poté byla směs centrifugována při  $4^{\circ}\text{C}$  a 10 000 g po dobu 10 minut na centrifuze Centrifuge 5415 R, Eppendorf (Německo). Supernatant byl opatrně odstraněn. Peleta obsahující jadernou frakci byla resuspendována ve 400  $\mu\text{l}$  0,2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Směs byla inkubována na otočném stojanu v lednici po dobu 30 minut a centrifugována na centrifuze Centrifuge 5415 R, Eppendorf (Německo) při  $4^{\circ}\text{C}$  a 16 000 g po dobu 10 minut. Peleta byla odstraněna a supernatant obsahující histony byl přenesen do nové zkumavky eppendorf. K supernatantu bylo přidáno 132  $\mu\text{l}$  100% trichloroctové kyseliny (TCA) kapku po kapce a zkumavky byly několikrát obráceny dnem vzhůru pro důkladné promíchání. Vzorky byly inkubovány na ledu 30 minut a poté centrifugovány při teplotě  $4^{\circ}\text{C}$  při 16 000 g po dobu

10 minut na centrifuze Centrifuge 5415 R, Eppendorf (Německo). Supernatant byl opatrně odstraněn a peleta obsahující histony byla 2x opláchnuta ledovým acetonem, který odstraňuje kyselinu z pelety, aniž by ji rozpustil. Po promytí byla směs centrifugována na centrifuze Centrifuge 5415 R, Eppendorf (Německo) při 4°C při 16 000 g po dobu 5 minut. Supernatant byl opatrně odstraněn a peleta obsahující histony byla sušena po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Následně byla peleta rozpuštěna ve 100 µl destilované vody a převedena do nové zkumavky eppendorf. Takto připravené vzorky byly uchovány v mrazícím boxu při -80°C pro další použití.

### **3.3.8 Příprava celobuněčného lyzátu**

Peleta obsahující celobuněčný lyzát dané buněčné linie pro analýzu proteinů pomocí metody Western blot byla resuspendována v dvojnásobném množství pufru RIPA, než byl její původní objem (složení: 50mM Tris-HCl pH 8; 150 mM chlorid sodný; 1% Igepal CA-630; 0,5% deoxycholát sodný; 0,1% SDS; proteasový inhibitor Complete™ Protease Inhibitor Cocktail ředěný v poměru 1/25). Buněčná suspenze byla inkubována na ledu 30-60 min a poté centrifugována při 4 °C po dobu 20 min při 16100 g. Supernatant obsahující proteiny byl přenesen do nové mikrozkušavky a byl uchován v mrazícím boxu při -80°C pro další použití.

### **3.3.9 Stanovení proteinů**

Koncentrace proteinů byla stanovována metodou dle Lowryho kolorimetricky v mikrotitračních destičkách za použití sady DC Protein Assay, BIO-RAD (USA). Stanovení vzorků byla prováděna vždy v triplicatu. K 5 µl standardů BSA o koncentraci  $c = 0 - 2,90 \mu\text{g/ml}$  a 5 µl vzorků bylo přidáno 25 µl roztoku A' připraveného smícháním 1000 µl roztoku A s 20 µl roztoku S. Následně bylo ke každému standardu i vzorku přidáno 200 µl roztoku B. Vzorky byly po přidání roztoků inkubovány 15 min za laboratorní teploty a mírného míchání na třepačce Swip KM-2, Edmund Bühler GmbH (Německo). Poté byla měřena jejich absorbance při 750 nm na spektrofotometru

VersaMax™ Microplate Reader, Molecular Devices (USA). Naměřená data byla vyhodnocena v programu SoftMax Pro.

### 3.3.10 SDS-PAGE elektroforesa

Celobuněčné lyzáty či extrahované frakce obsahující histony byly elektroforeticky rozděleny na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS). Zatímco při detekci onkogenů Nmyc a c-Myc byl používán 11% separační gel (složení: 2,5 ml 1,5M Tris pH 8,8; 2,5 ml 40% AA mix (akrylamid/bis-akrylamid = 29/1); 100 µl 10% SDS; 10 µl TEMED; 100 µl 10% APS; doplněno ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu 10 ml), acetylované histony H3 a H4 byly detekovány s použitím 16% separačního gelu (složení: 3,9 ml 1,5M Tris pH 8,8; 3,75 ml 40% AA mix (akrylamid/bis-akrylamid = 29/1); 100 µl 10% SDS; 10 µl TEMED; 100 µl 10% APS; doplněno ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu 10 ml). Ten byl nejprve nalit mezi skla a převrstven 200 µl isopropanolu. Po zatuhnutí byl odmyt isopropanol a separační gel byl přelit 6% zaostřovacím gelem (složení: 1,25 ml 1M Tris pH 6,8; 750 µl 40% AA mix; 50 µl 10% SDS; 10 µl TEMED; 50 µl 10% APS; doplněno ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu 5 ml), do kterého byly vloženy hřebeny pro tvorbu jamek určených k nanesení vzorků. Skla s gelem byla vložena do aparatury pro vertikální elektroforesu. Po přidání elektrodového pufru (složení zásobního roztoku: 1,51 g Tris; 9,4 g glycinu; 0,5 g SDS ve 450 ml destilované vody) do aparatury byly vyjmuty hřebeny a byly odstraněny bubliny. Poté byl k jednotlivým vzorkům ředěným ddH<sub>2</sub>O na požadovanou koncentraci proteinu na jamku přidán vzorkový pufr Laemmli 6x (složení: 375mM Tris-HCl pH 6,8; 9% SDS; 50% glycerol; 9% merkaptonethanol; 0,03% bromfenolová modř) v poměru 1/5. Směsi byly inkubovány po dobu 5 minut při teplotě 95 °C. Do první jamky bylo nanášeno 5 µl proteinového standardu SeeBlue® Plus 2 Prestained Standard, Invitrogen (USA). Elektroforetická separace proteinů probíhala 80 minut ve vertikálním uspořádání v elektroforetické aparatuře Vertical Electrophoresis Unit, Sigma (USA) při pH 8,5 a konstantním proudu 20mA na jednu elektroforetickou desku. Po elektroforetickém rozdělení byly proteiny přeneseny metodou Westernblot na nitrocelulosovou membránu (viz. kapitola 3.3.11 na str. 45).

V případě kontroly čistoty izolace histonové frakce, která předchází samotnému Westernblotu, byly připravené akrylamidové gely barveny Coomassie Brilliant Blue (50% methanol; 10% kyselina octová; 40% ddH<sub>2</sub>O; 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250) za laboratorní teploty a mírného míchání na třepačce Swip KM-2, Edmund Bühler GmbH (Německo). Barvení bylo kompletní, pokud polyakrylamidový gel nebyl viditelný v tmavě modré obarvovací lázni. Následně byly gely několikrát promyty ddH<sub>2</sub>O a odbarvovány v odbarvovacím roztoku (složení: 16,5% ethanol; 5% kyselina octová; 78,5% ddH<sub>2</sub>O), dokud nebyly opět čiré. Takto připravené gely byly použity pro vyhodnocení čistoty izolace kyselých extrahovaných histonů, u nichž měla být sledována acetylace histonů pomocí metody Westernblot.

### 3.3.11 Westernblot

Do aparatury Mini Trans-Blot Cell, BIO-RAD (USA) byly umístěny postupně „fiber“, filtrační papír, nitroceluloseová membrána (0,45 µm), elektroforetický gel, filtrační papír a „fiber“. Aparatura byla ponořena do přenosového pufru (složení: 3,05 g Tris 14,5 g glycínu v 10% methanolu) a následně připojena ke zdroji napětí, na kterém byl nastaven konstantní proud 350mA po dobu 80 minut. Nitroceluloseové membrány byly nejprve obarveny v 0,2% roztoku Ponceau S pro kontrolu správného přenosu a poté odbarveny roztokem PBS. Pro zajištění omezení nespecifických interakcí mezi proteiny a primární protilátkou byly membrány 1 hodinu blokovány v blokovacím pufru (složení: 5% mléko BIO-RAD; 0,25% TWEEN 20 v PBS) za mírného míchání na přístroji GyroTwister S1000, Labnet (USA) při pokojové teplotě.

Membrána byla inkubována se specifickou primární protilátkou (H4 1/1000, H3 1/4000, Santa Cruz Biotechnology (USA); c-Myc 1/500, N-Myc 1/1000, Santa Cruz Biotechnology (USA)) v 5% mléce BIO-RAD v pufru C (složení: 1 ml 20% TWEEN 20 ve 400 ml PBS) přes noc při teplotě 4°C za stálého míchání pomocí GyroTwister, Labnet (USA). Poté byly membrány postupně 3x promyty 15-20 ml pufru C pomocí vakuové aparatury SNAP i.d., Millipore (USA) a inkubovány při pokojové teplotě 10 minut se sekundární kozí protilátkou proti králíčí či myší IgG s HRP konjugátem 1/2000) ředěnou v 0,1% mléce BIO-RAD v pufru C. Po ukončení inkubace byla protilátka vakuově odsáta a membrána byla opět promyta 3x 15-20 ml roztoku pufru C. Používaná sekundární protilátka je konjugována s enzymem HRP (křenuv peroxidasa), který v přítomnosti

peroxidu vodíku způsobuje katalýzu oxidace substrátu luminolu a vznik chemiluminiscence. Reagencie soupravy Immun-Star™ HRP Chemiluminescent Kit, Bio-Rad (USA) byly smíchány v poměru 1/1 (dále uváděno jako substrát). Na každou membránu o velikosti 7 x 5 cm byly aplikovány 2 ml substrátu, inkubace probíhala 3 minuty. Poté byla membrána osušena od přebytečného substrátu a vložena do vyvolávací kazety CAWO ABS X-ray cassette, CAWO (Německo). Chemiluminiscenční signál byl vyvolán ve fotokomoře na film FOMA (Česká Republika) v přístroji FOMA Optimax (Česká Republika).

### **3.3.12 Izolace nukleární buněčné frakce pro stanovení enzymových aktivit**

Pro izolaci jaderného buněčného extraktu byla použita sada chemikálií Nuclear/Cytosol Fractionation Kit, Biovision (USA), která umožňuje ve vzorcích savčích buněk rychlé oddělení jaderného extraktu od cytoplasmatické frakce bez výrazné kontaminace proteinové směsí. Takto extrahované jaderné a cytoplasmatické proteinové frakce jsou kompatibilní se soupravami pro stanovení aktivity HAT a HDAC.<sup>109</sup>

Lidské neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS, SH-SY5Y, UKF-NB-3 a UKF-NB4 a lidská buněčná linie A549 odvozená z alveolárního plicního karcinomu, byly 24 hodin kultivovány při teplotě 37°C v inkubátoru Jouan IGO 150 (Francie) v normoxii (O<sub>2</sub> 21 %, CO<sub>2</sub> 5 %, vlhkost vzduchu 95 %) a v hypoxii (O<sub>2</sub> 1 %, CO<sub>2</sub> 5 %, N<sub>2</sub> 94 %) v komůrce C-Chamber Proox model C21, Biospherix (USA). Poté byly buňky mechanicky sklizeny, promyty 2x1 ml PBS a centrifugovány na centrifuze Centrifuge 5415 R, Eppendorf (Německo) při 4°C při 600 g po dobu 5 minut. K peletě bylo následně na ledu přidáno 200 µl roztoku CEB-A mix (složení: 1 ml roztoku CEB-A; 2 µl proteasového inhibitoru). Vzorek byl vortexován na přístroji Vortex Genie 2, Scientific Industries (USA) při maximálních otáčkách 15 sekund a následně byl na ledu inkubován po dobu 10 minut. Poté bylo ke směsi přidáno 11 µl vychlazeného CEB-B roztoku, směs byla vortexována 5 sekund a inkubována na ledu 1 minutu. Směs byla 5 sekund vortexována a centrifugována při 4°C při 16 000 g po dobu 5 minut. Zatímco supernatant (cytosolární frakce) byl odebrán, převeden do vychlazené zkumavky eppendorf a uchován v mrazícím boxu při -80°C pro další použití, peleta (jaderná frakce) byla resuspendována v 50 µl vychlazeného roztoku NEB mix (složení: 1 ml roztoku NEB; 2 µl proteasového

inhibitoru). Směs byla vždy 15 sekund vortexována a poté inkubována 10 minut na ledu celkem po dobu 40 minut. Následně byl vzorek centrifugován při 4°C při 16 000 g po dobu 10 minut. Supernatant byl odebrán a převeden do vychlazené zkumavky eppendorf jako jaderná frakce. Ve vzorcích jaderných frakcí byla stanovena koncentrace proteinů soupravou DC Protein Assay, BIO-RAD (USA), viz. kapitola 3.3.9 str. 44. Následně byly ve vzorcích prostřednictvím komerčních kitů kolorimetricky stanoveny aktivity HAT a HDAC.

### **3.3.13 Kolorimetrické stanovení aktivity HAT**

Kolorimetrické stanovení aktivity histonacetyltransferas (HAT) bylo provedeno pomocí soupravy HAT Activity Colorimetric Assay Kit, BioVision (USA), který je vhodným, neradioaktivním systémem rychlé a citlivé detekce aktivity HAT ve vzorcích savčích buněk.

Acetylace peptidového substrátu aktivními HAT uvolňuje volnou formu CoA, který poté slouží jako esenciální koenzym pro produkci NADH. NADH může být velmi snadno detekován spektrofotometricky reakcí s rozpustným tetrasolovým činidlem. Tato detekce poskytuje vhodný prostředek pro kinetické studie.<sup>110</sup>

Stanovení aktivity HAT bylo provedeno v tripletech. Na ledu bylo ke 30 µg jaderné frakce jednotlivých vzorků přidáno příslušné množství ddH<sub>2</sub>O tak, aby výsledný objem směsi byl 40 µl. Následně bylo ke každému vzorku v 96ti-jamkové mikrotitrační destičce přidáno 68 µl roztoku Assay Mix (složení: 50 µl 2x HAT Assay Buffer; 5 µl HAT Substrate I; 5 µl HAT Substrate II; 8 µl NADH Generating Enzyme) a směs byla důkladně promíchána pro zahájení reakce. Mikrotitrační destička se vzorky byla inkubována při 37°C po dobu minimálně 1 hodiny. Optická densita jednotlivých vzorků byla měřena na spektrofotometru Molecular VersaMax™ Microplate Reader, Molecular Devices (USA) při vlnové délce 440 nm.

### **3.3.14 Kolorimetrické stanovení aktivity HDAC**

Pro kolorimetrické stanovení aktivity histondeacetylasy (HDAC) byla použita souprava HDAC Activity Colorimetric Assay Kit, BioVision (USA), která představuje

rychlou a vhodnou kolorimetrickou metodu, ze které je vyloučena zároveň radioaktivita, extrakce a chromatografie, které jsou tradičně součástí komerčních protokolů. V prvním kroku jsou vzorky, které obsahují aktivní HDAC, inkubovány s HDAC kolorimetrickým substrátem. Deacetylase substrátu vyvolá jeho podráždění, a tak se ve druhém kroku, zahrnujícím inkubaci vzorku s “Lysine Developer“, produkuje chromofor. Tento chromofor může být velmi snadno analyzován prostřednictvím spektrofotometru.<sup>111</sup>

Stanovení aktivity HDAC bylo provedeno v tripletech. Na ledu bylo ke 30  $\mu\text{g}$  jaderné frakce jednotlivých vzorků přidáno příslušné množství  $\text{ddH}_2\text{O}$  tak, aby výsledný objem směsi byl 85  $\mu\text{l}$ . Pro ověření věrohodnosti komerční soupravy bylo použito 30  $\mu\text{g}$  jaderné frakce plicní buněčné linie A549 odvozené od alveolárního karcinomu, k níž bylo přidáno nejprve příslušné množství  $\text{ddH}_2\text{O}$  tak, aby výsledný objem směsi byl 83  $\mu\text{l}$  a poté 2  $\mu\text{l}$  100mM kyseliny valproové rozpuštěné v  $\text{ddH}_2\text{O}$ , která inhibuje aktivitu HDAC.

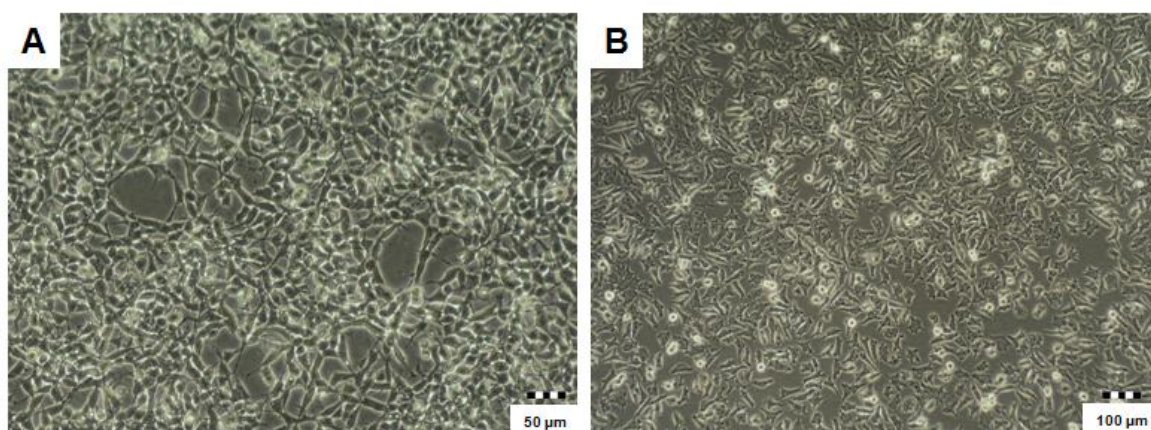
Ke každému vzorku v 96ti-jamkové mikrotitrační destičce bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  roztoku 10x HDAC AssayBuffer, který byl temperován na pokojovou teplotu a 5  $\mu\text{l}$  roztoku HDAC colorimetric substrate. Směs byla důkladně promíchána pro zahájení reakce. Mikrotitrační destička se vzorky byla inkubována v inkubátoru Jouan IGO 150 (Francie) při teplotě 37°C po dobu minimálně 1 hodiny. Reakce byla zastavena přidáním 10  $\mu\text{l}$  roztoku “Lysine Developer“ do směsi a jejím důkladným promícháním. Vzorky byly poté inkubovány v inkubátoru Jouan IGO 150 (Francie) při teplotě 37°C po dobu 30 minut a optická densita jednotlivých vzorků byla měřena na spektrofotometru Molecular VersaMax™ Microplate Reader, Molecular Devices (USA) při vlnové délce 400 nm.



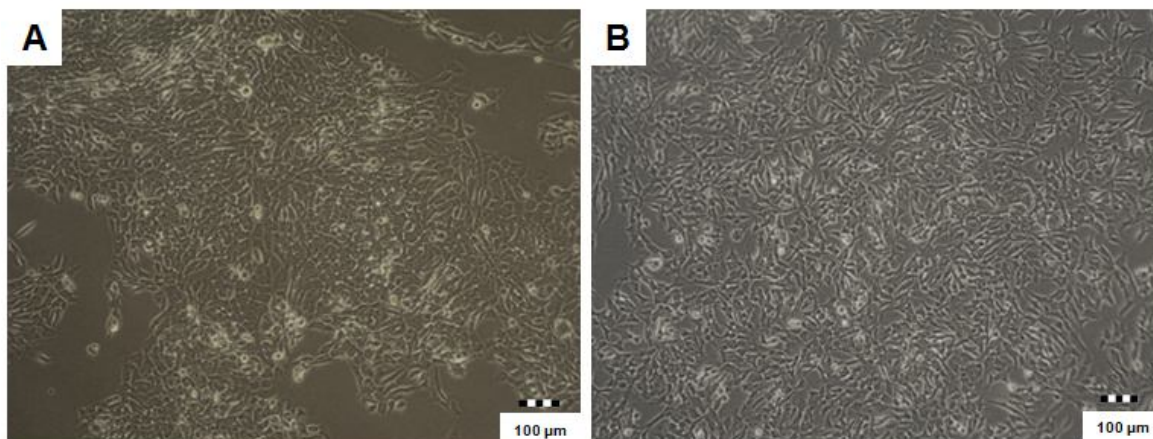
## 4 Výsledky

Acetylace histonů je jednou z nejvýznamějších epigenetických modifikací, která vede k rozvolnění chromatinové struktury. DNA je tak přístupná transkripčním faktorům a podléhá snáze transkripci.<sup>72</sup> Nedostatek kyslíku, který je příkladem stresových kultivačních podmínek, může vést ke zvýšení či snížení acetylace histonů v buněčném jádře.<sup>112</sup> Klíčovou roli při hypoxickém stresu, a tedy i změně acetylace histonů, hraje nejen aktivita histonacetyltransferas (HAT) a histondeacetylas (HDAC),<sup>113,114</sup> ale také hladiny onkogenů N-Myc a c-Myc spolu s hladinami transkripčního faktoru HIF-1,<sup>104,115</sup> které v nádorové buňce aktivují transkripci mnoha glykolytických genů typických pro Warburgův efekt.<sup>3</sup>

Experimenty popisované v této diplomové práci byly prováděny na čtyřech lidských neuroblastomových buněčných liniích vysokého rizika kultivovaných při 37°C paralelně při standardních kultivačních podmínkách a při nedostatku kyslíku (hypoxie, O<sub>2</sub> 1 %). Konkrétně se jednalo o neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3, UKF-NB-4, SK-N-AS a SH-SY5Y uvedené na obrázcích č. 12, 13 na str. 49 a 50, které se od sebe liší nejen buněčným fenotypem a přestavbou distální části krátkého ramene chromosomu 1 (1p31-term), ale zejména amplifikací genu N-Myc považovaného za negativní prognostický znak tohoto nádorového onemocnění. Zatímco pro buněčné linie UKF-NB-3 a UKF-NB-4 (Obrázek č. 12 na str. 49) je charakteristická amplifikace onkogenu N-Myc, druhé dvě studované neuroblastomové linie SK-N-AS a SH-SY5Y (Obrázek č. 13 na str. 50) jsou buněčné linie bez amplifikace tohoto genu.<sup>90, 116, 117</sup>



**Obrázek č. 12 - Lidské neuroblastomové buněčné linie s amplifikací onkogenu N-Myc:**  
**A)** UKF-NB-3 (N-typ) **B)** UKF-NB-4 (S-typ). Pořízeno fotoaparátem Olympus C-5050 připojeným k mikroskopu Olympus IX51 (Česká republika). Buněčná linie UKF-NB-3 zvětšena 400x, buněčná linie UKF-NB-4 zvětšena 200x.



**Obrázek č. 13 - Lidské neuroblastomové buněčné linie bez amplifikace onkogenu N-Myc:** **A)** SK-N-AS (S-tyt), **B)** SH-SY5Y (N-tyt). Pořízeno fotoaparátem Olympus C-5050 připojeným k mikroskopu Olympus IX51 (Česká republika). Obě buněčné linie zvětšeny 200x.

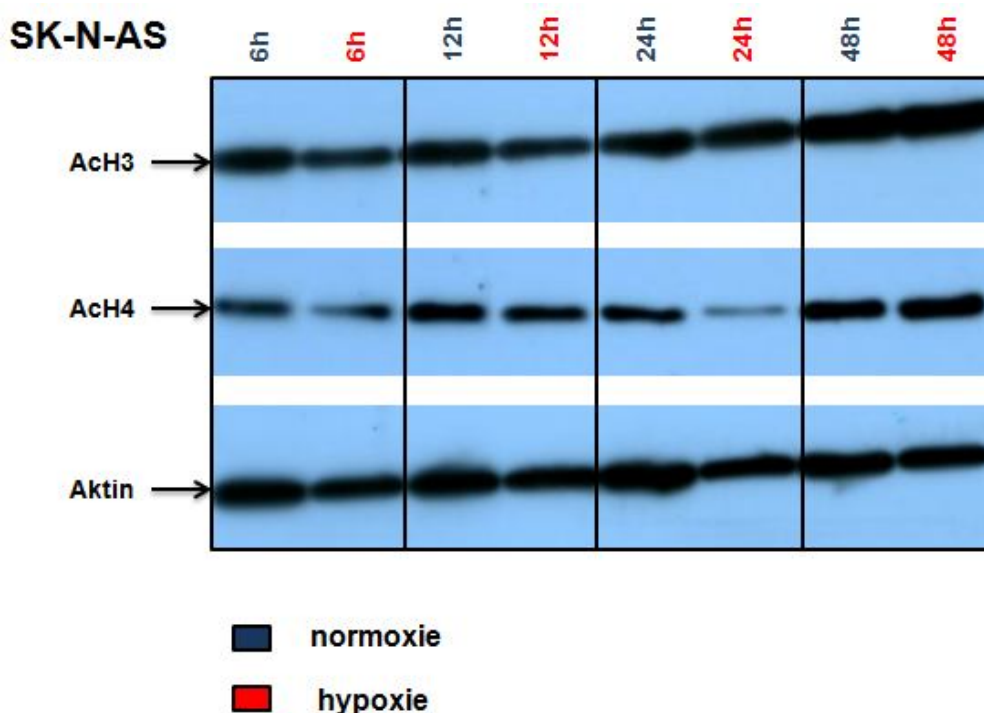
#### 4.1 Acetylce histonů H3 a H4 neuroblastomových buněčných linií

Acetylce histonů H3 a H4 byla v předkládané diplomové práci studována prostřednictvím metody Westernblot. Zásadním krokem přípravy vzorků pro následnou detekci acetylce histonů byl výběr vhodné extrakční metody, z nichž většina je založena na rozpustnosti histonů v kyselém prostředí, která by vedla k jejich zakonzentrování v dané směsi a neměla přitom vliv na nativní posttranslační modifikace.<sup>118,119</sup>

Nejprve byly jednotlivé vzorky připravovány kyselou extrakcí s následnou dialýzou dle postupu popsaného v pracovním listě k protilátce H4 (Lot#29867) od firmy Upstate (viz. kapitola 3.3.6 na str. 41).<sup>106</sup> V extrahovaných vzorcích neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS (S-tyt) bez amplifikace onkogenu N-Myc, inkubovaných při teplotě 37°C po dobu 6, 12, 24 a 48 hodin paralelně při standardních kultivačních podmínkách a při nedostatku kyslíku (hypoxie, O<sub>2</sub> 1 %), bylo provedeno stanovení koncentrace celkového proteinu a následně v nich byla metodou Westernblot za použití specifické protilátky anti-acetyl-H3 a anti-acetyl-H4 detekována acetylce histonů H3 a H4. Shodné množství proteinu v jamkách při elektroforetické separaci bylo ověřeno detekcí exprese aktinu o molekulové hmotnosti 41,8 kDa (viz. Obrázek č. 14 na str. 51).

Zatímco acetylce histonů H4 po 48h kultivaci v hypoxii a acetylce histonů H3 ve všech sledovaných časech u této buněčné linie zůstávaly v hypoxii s ohledem na aktin oproti normoxickým vzorkům téměř beze změny, pokles acetylce histonů H4 byl pozorován v čase 6h, 12h a zejména v čase 24h. Tyto výsledky byly vyhodnoceny jako

korelující se studií Q. Li a M. Costy z r. 2009<sup>10</sup>, která popisuje výrazné snížení acetylce histonů H4 u lidské buněčné linie A549 odvozené od plicního alveolárního karcinomu po 24h kultivaci v hypoxických podmínkách v porovnání se standardními kultivačními podmínkami.

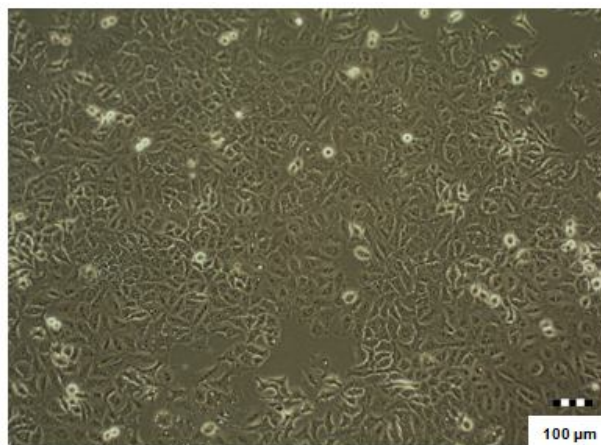


**Obrázek č. 14 - Acetylce histonů H3 a H4 neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS kultivované při teplotě 37°C paralelně v normoxii a v hypoxii (O<sub>2</sub> 1 %) po dobu 6h, 12h, 24h a 48h. Detekováno metodou Westernblot s použitím kyselé extrakce s následnou dialýzou dle pracovního listu k protilátce H4 (Lot#29867) od firmy Upstate<sup>106</sup> pro přípravu vzorků: Koncentrace vzorků 10 µg celkového proteinu na jamku. Doba expozice při vyvolávání: AcH3: 2minuty, AcH4: 15 minut, aktin: 5 sekund.**

Změny acetylce histonů pozorované mými kolegy v laboratoři kliniky dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy ve vzorcích neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-3 a UKF-NB4 připravených stejnou extrakční metodou však s výsledky studie Q. Li a M. Costy z r. 2009<sup>10</sup> nekorelovaly. U těchto vzorků nebylo výše popsané snížení acetylce histonů H4 v čase 24h v hypoxii pozorováno.<sup>10,120</sup> Naopak ve vzorcích obou linií kultivovaných 6h, 12h, 24h i 48h v hypoxii byla zaznamenána zvýšená hladina acetylce histonů H4.

Zda je v hypoxii rozdílná acetylce histonů H4 u testovaných neuroblastomových buněčných linií způsobená použitím jiné extrační metody při přípravě jednotlivých vzorků, než byla použita v práci Q. Li a M. Costy z r. 2009<sup>10</sup>, bylo ověřeno

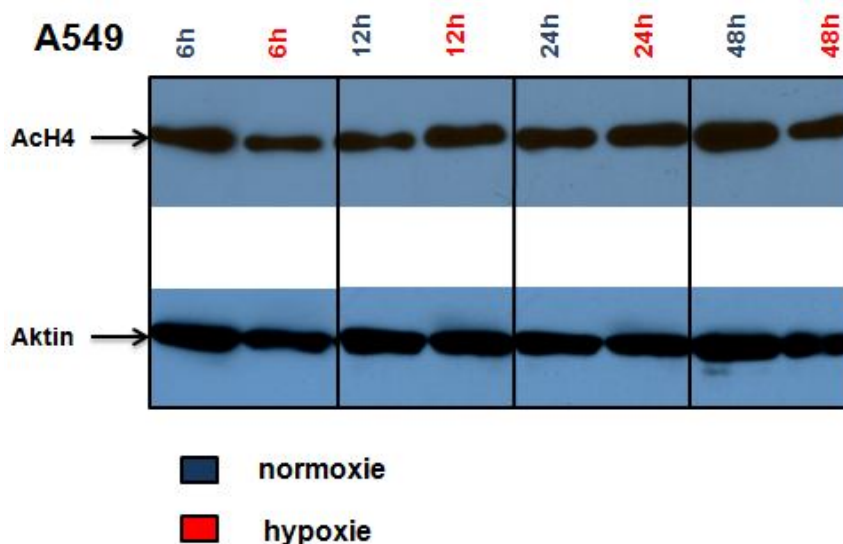
dvěma způsoby. Jednak byla zakoupena buněčná linie A549 odvozená z alveolárního plicního karcinomu od firmy ATCC (Obrázek č. 15), na které byly ve studii Q. Li a M. Costy<sup>10</sup> výsledky získány a experimenty byly provedeny se vzorky této buněčné linie, připravenými v naší laboratoři zavedenou metodou kyselé extrakce. Kromě toho byla acetylace histonů H4 sledována u vzorků buněčné linie A549, připravených extrakcí dle Q. Li a M. Costy.<sup>10</sup>



**Obrázek č. 15 - Lidská buněčná linie A549 odvozená z alveolárního plicního karcinomu s amplifikací onkogenu c-Myc:** Snímek pořízen fotoaparátem Olympus C-5050 připojeným k mikroskopu Olympus IX51 (Česká republika). Zvětšeno 200x.

Z obrázku č. 16 na str. 53 je patrné, že ve vzorcích lidské buněčné linie A549 odvozené od alveolárního plicního karcinomu s amplifikací onkogenu c-Myc, které byly připraveny kyselou extrakcí s následnou dialýzou, bylo pozorováno mírné snížení acetylace histonů H4 v hypoxii v čase 6h a 48h a naopak její zvýšení v čase 12h a 24h.



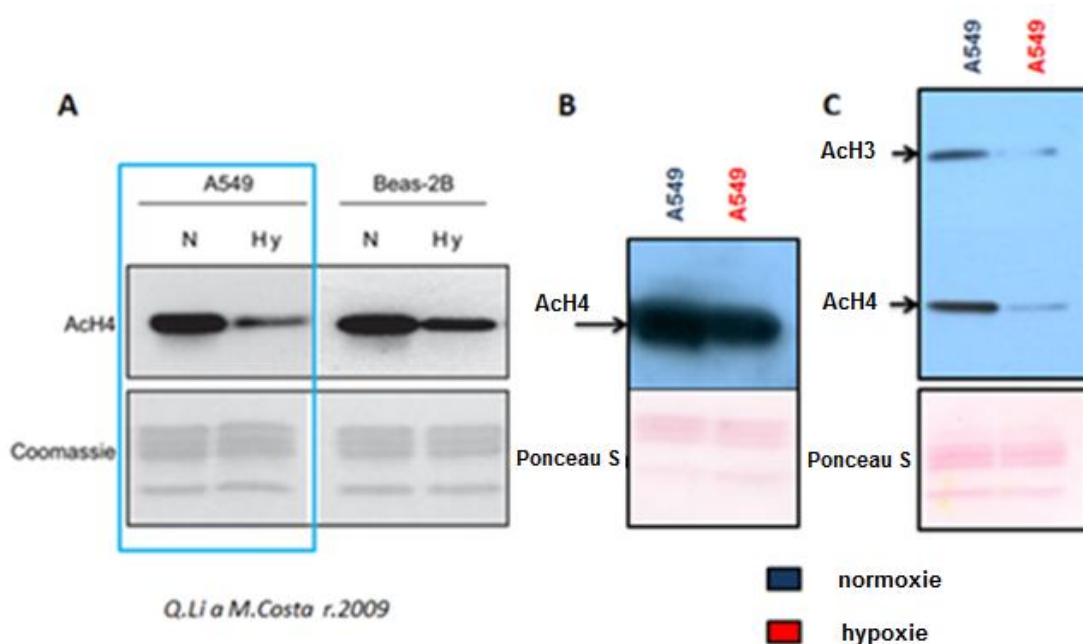


**Obrázek č. 16 - Acetylace histonů H4 ve vzorcích lidské buněčné linie A549 odvozené od alveolárního plicního karcinomu s amplifikací onkogenu c-Myc, kultivovaných při teplotě 37°C paralelně v hypoxii a v normoxii po dobu 6h, 12h, 24h a 48h. Detekováno metodou Westernblot. Vzorky připraveny s použitím kyselé extrakce s následnou dialýzou: Koncentrace vzorků 15 µg celkového proteinu na jamku. Doba expozice při vyvolávání: AcH4: 15 minut, aktin: 5 sekund.**

Změna acetylace histonů H4 po 24 hodinové kultivaci v normoxii a hypoxii u námi připravených vzorků lidské buněčné linie A549 odvozené od alveolárního plicního karcinomu s amplifikací onkogenu c-Myc neodpovídala výsledkům uvedeným ve studii Q. Li a M. Costy z r. 2009<sup>10</sup>. Pro vyloučení možného vlivu námi zvolené extrakce histonů byla provedena izolace frakce histonů za použití metody popisované přímo ve studii Q. Li a M. Costy z r. 2009<sup>10</sup>, která je založena na lýze buněk následované kyselou extrakcí v prostředí kyseliny sírové.<sup>10</sup> Tato metoda byla dále optimalizována a následně zcela nahrazena kyselou extrakcí s následným srážením trichloroctovou kyselinou (TCA), která je ve studii D. Shechter a kol. z r. 2007 doporučena jako postup pro izolaci čisté frakce obsahující histony (podrobný postup viz. kapitola 3.3.7 na str. 42).<sup>108</sup>

Narozdíl od vzorku lidské buněčné linie A549 odvozené od alveolárního plicního karcinomu s amplifikací onkogenu c-Myc, připraveného kyselou extrakcí s následnou dialýzou, vzorek stejné linie připravený lýzou buněk následovanou kyselou extrakcí v prostředí kyseliny sírové dle Q. Li a M. Costy z r. 2009<sup>10</sup> či kyselou extrakcí s následným srážením TCA dle D. Shechter a kol. z r. 2007<sup>108</sup> vykazoval sníženou acetylaci histonů H3 a H4 po 24 hodinové kultivaci buněk v hypoxii oproti vzorkům

kultivovaným v normoxii, stejně jako popsali Q. Li a M. Costa ve zmiňované studii z r. 2009 (viz. Obrázek č. 17 na str. 54).<sup>10</sup>



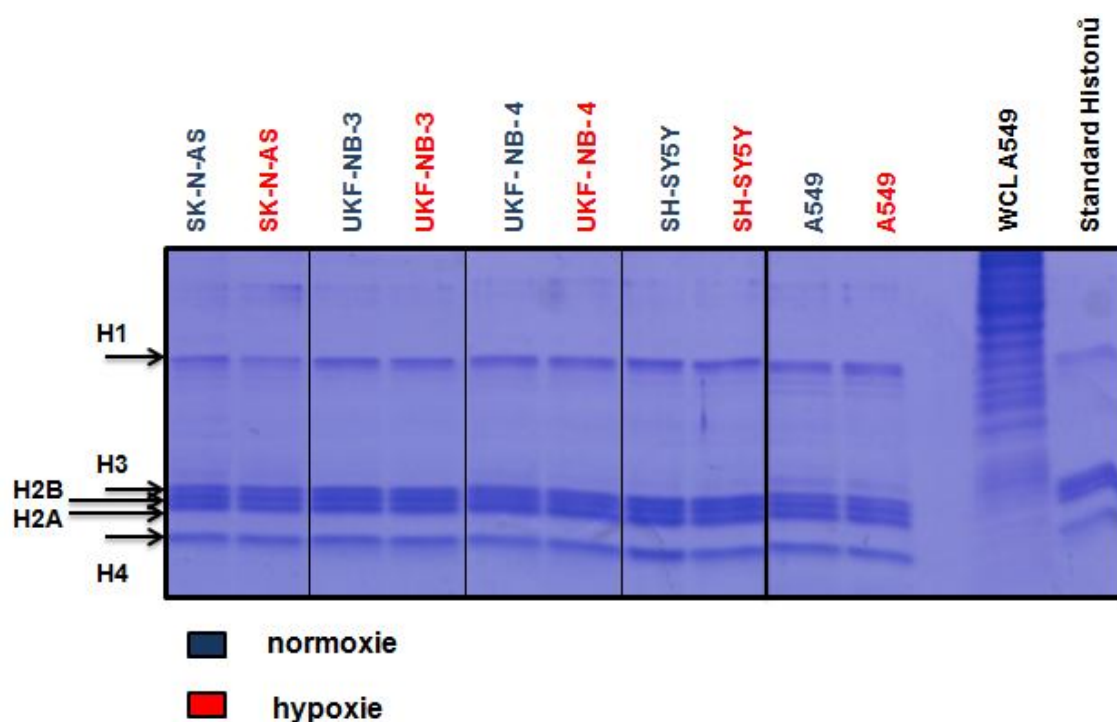
**Obrázek č. 17 - Acetylace histonů H4 lidské buněčné linie A549 odvozené od alveolárního plicního karcinomu a kultivované při teplotě 37°C paralelně v normoxii a v hypoxii po dobu 24h. Detekováno metodou Westernblot: A) Výsledek publikace Q. Li a M. Costy z r. 2009<sup>10</sup> B) Výsledek získaný s použitím lýzy buněk následované kyselou extrakcí v prostředí kyseliny sírové dle Q. Li a M. Costy z r.2009<sup>10</sup> C) Výsledek získaný s použitím kyselé extrakce s následným srážením TCA pro přípravu vzorků dle D. Shechtera a kol. z r. 2007.<sup>108</sup> Koncentrace vzorků 5 µg celkového proteinu na jamku. Doba expozice při vyvolávání: AcH3: 30sekund, AcH4: 1 minutu.**

Vzhledem ke shodě a kvalitě získaného výsledku byla v dalších experimentech upřednostněna kyselá extrakce s následným srážením TCA dle D. Shechtera a kol. z r. 2007<sup>108</sup>. Vliv kultivačních podmínek na acetylaci histonů H3 a H4 byl u všech studovaných buněčných linií sledován pouze po 24 hodinách. Buněčná linie A549 byla dále používána pro ověření správnosti izolace jaderné frakce při přípravě jednotlivých vzorků testovaných neuroblastomových buněčných linií při sledování acetylace histonů H3 a H4.

Vzorky lidských neuroblastomových buněčných linií SK-N-AS, UKF-NB-3, UKF-NB-4, SH-SY5Y a buněčné linie A549 odvozené od plicního alveolárního karcinomu byly připravené kyselou extrakcí s následným srážením TCA dle protokolu D. Shechtera a kol.<sup>108</sup>. Čistota jejich izolace byla ověřena prostřednictvím SDS-PAGE elektroforesy

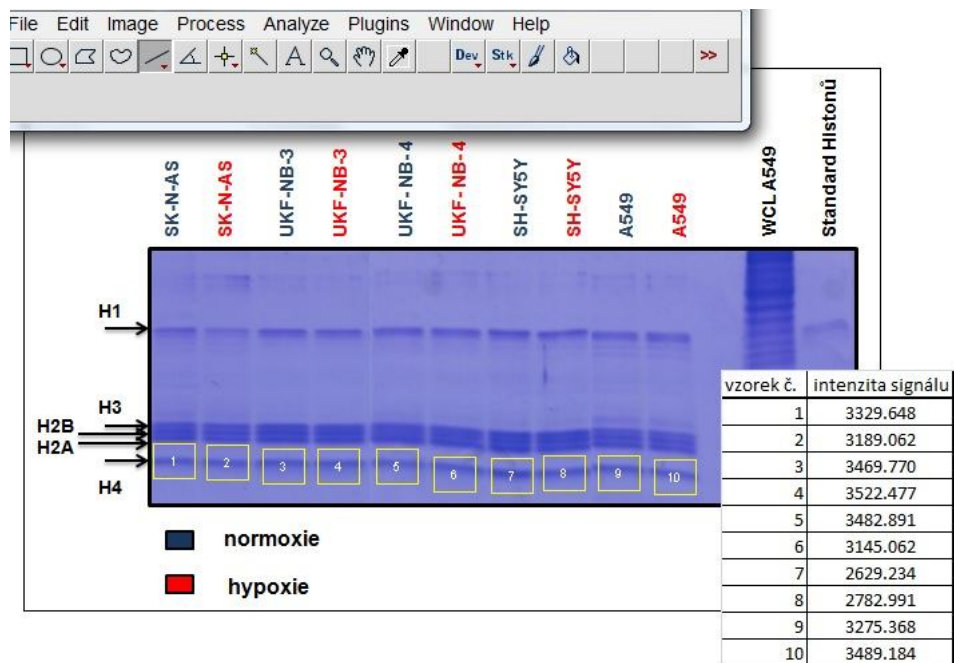
(viz. kapitola 3.3.10 na str. 44) s následným obarvením gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue. Tato metoda představuje obecně spolehlivý způsob kontroly čistoty izolace, který je schopen detekovat i velmi nízké koncentrace proteinu  $c_p = 0,1 \mu\text{g}$ .<sup>108</sup>

Jak je patrné z obrázku č. 18 na str. 55, výsledkem kyselé extrakce s následným srážením TCA dle D. Shechtera a kol.<sup>108</sup> bylo oddělení čisté frakce obsahující směs histonů H1, H2A, H2B, H3 a H4 o molekulové hmotnosti 21,5 kDa, 14,0 kDa, 13,8 kDa, 15,3 kDa a 11,3 kDa s minimálním obsahem dalších složek. Navíc tato separace byla šetrná k nativnímu stavu histonů a jejich posttranslačním modifikacím.



**Obrázek č. 18 - Frakce histonů izolované s použitím kyselé extrakce s následným srážením TCA, vizualizované na elektroforetickém gelu obarveném Coomassie Brilliant Blue. Jednotlivé buněčné linie kultivované 24h při teplotě 37°C paralelně v hypoxii a v normoxii: neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS, UKF-NB-3, UKF-NB-4 a SH-SY5Y; buněčná linie A549 odvozená od alveolárního plicního karcinomu, WCL - celobuněčný lyzát linie A549, Standard Histons - standardní vzorek obsahující čistou frakci histonů z telecího brzlíku.**

Z obrázku č. 18 na str. 55 byla následně odečtena intenzita elektroforetických signálů odpovídající histonům H3 a H4 vzájemným porovnáním příslušné plochy pod křivkou v programu ImageJ (viz. Obrázek č. 19 na str. 56). Finální hodnoty intenzit signálů byly vztaženy ke vzorku s nejnižší intenzitou a výsledkem byly přibližné poměry mezi jednotlivými objemy vzorků, které byly následně použity pro metodu Westernblot.

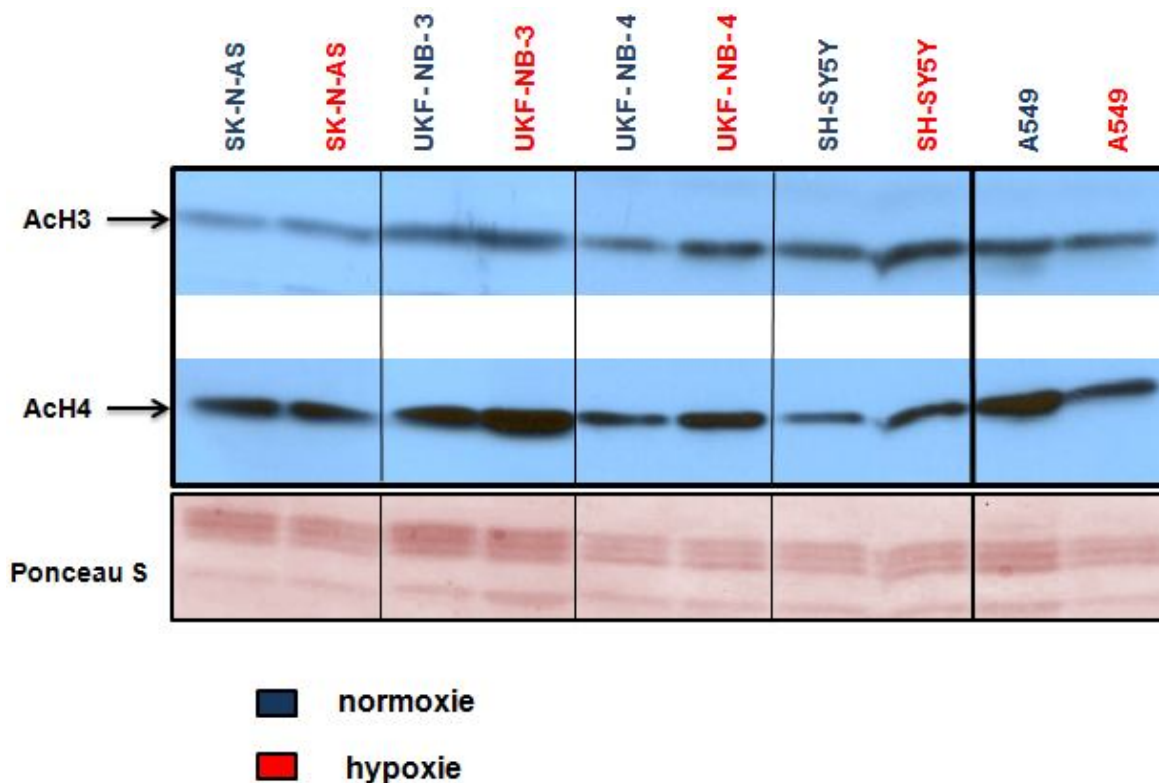


Obrázek č. 19 - Porovnání intenzity signálu histonů H4 jednotlivých linií v programu ImageJ

Odečtení intenzit elektroforetických signálů odpovídajících histonům H3 a H4 v programu ImageJ bylo však dosti nepřesné. Ze stejného důvodu bylo pro nanesení shodného množství proteinů jednotlivých vzorků do jamek v elektroforetickém gelu pro detekci acetylce histonů H3 a H4 metodou Westernblot použito kolorimetrické stanovení koncentrace celkového proteinu (viz. kapitola 3.3.9 na str. 43).

Na základě známé koncentrace celkového proteinu v jednotlivých vzorcích čtyř neuroblastomových buněčných linií a buněčné linie A549 odvozené od alveolárního plicního karcinomu, kultivovaných při teplotě 37°C po dobu 24 hodin paralelně při standardních kultivačních podmínkách a při nedostatku kyslíku (hypoxie, O<sub>2</sub> 1 %) a poté extrahovaných s použitím kyselé extrakce s následným srážením TCA, byla ve frakcích obsahujících histony prostřednictvím specifických protilátek anti-acetyl-H3 a anti-acetyl-H4 detekována acetylce histonů H3 a H4 metodou Westernblot (viz. Obrázek č. 20 na str. 57). Zatímco neuroblastomová buněčná linie SK-N-AS (S-typ) bez amplifikace onkogenu N-Myc nevykazovala viditelnou změnu acetylce v normoxických a hypoxických podmínkách, pro buněčnou linii SH-SY5Y (N-typ) bez amplifikace avšak se zmnožením daného onkogenu, kultivovanou v hypoxii bylo typické zvýšení acetylce H3 a H4 oproti normoxickým vzorkům. Navíc, bylo v hypoxii pozorováno zvýšení acetylce histonů H4 u neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3 (N-typ) a zvýšení acetylce obou histonů u neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 (S-typ), které obě mají amplifikaci onkogenu N-Myc.





**Obrázek č. 20 - Acetylace histonů H3 a H4 jednotlivých buněčných linií kultivovaných při teplotě 37°C paralelně v normoxii a v hypoxii po dobu 24h. Detekováno metodou Westernblot, frakce histonů připraveny kyselou extrakcí s následným srážením TCA: neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS, UKF-NB-3, UKF-NB-4 a SH-SY5Y; buněčná linie A549 odvozená z alveolárního plicního karcinomu. Koncentrace vzorků 5 µg celkového proteinu na jamku. Doba expozice při vyvolávání: AcH3: 30 sekund, AcH4: 1 minutu.**

V případě použití kyselé extrakce s následným srážením trichloroctovou kyselinou (TCA) k přípravě vzorků pro sledování acetylace histonů H3 a H4 metodou Westernblot bylo nanesení shodného množství proteinu do jamek při elektroforetické separaci ověřeno obarvením nitrocelulosoové membrány barvicím roztokem Ponceau S. Ověření stejného množství proteinu v jamkách detekcí exprese aktinu, který je exprimován ve všech buňkách ve shodné standardní hladině, v tomto případě nebylo možné. Aktin by totiž neměl být v ideálním případě izolace ve vzorku obsahujícím pouze směs histonů zastoupen a jeho přítomnost by svědčila pouze o stupni znečištění izolované frakce.

Rozdíly mezi acetylacemi H3 a H4 u neuroblastomových linií kultivovaných 24 hodin za standardních kultivačních podmínek a v hypoxii ( $O_2$  1 %) mohou být způsobeny odlišnou aktivitou enzymů histonacetyltransferas (HAT) a histondeacetyltras (HDAC) při různých kultivačních podmínkách. Tento předpoklad byl experimentálně ověřen a je popsán v kapitole 4.2 této diplomové práce.

## 4.2 Aktivita histonacetyltransferas a histondeacetylasy

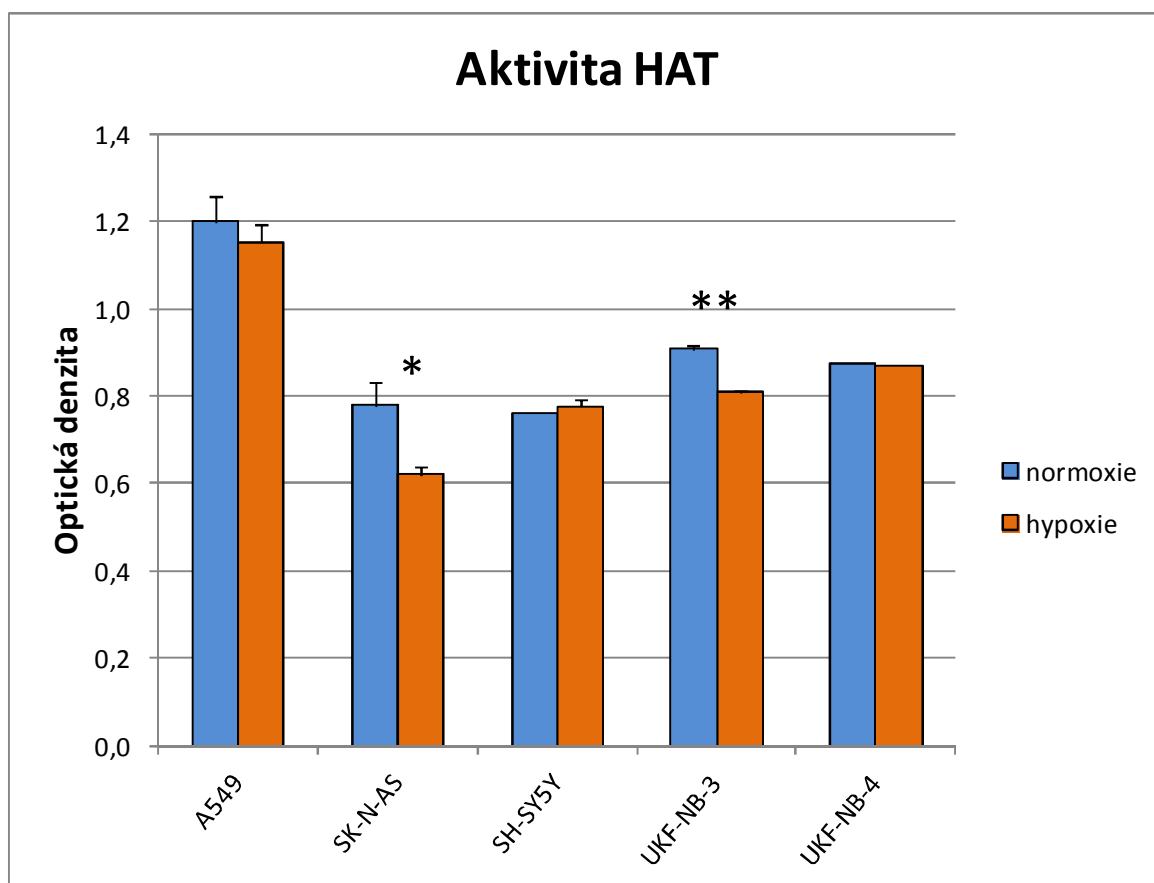
Histonacetyltransferasy (HAT) a histondeacetylasy (HDAC) v buňce udržují rovnováhu mezi acetylací a deacetylací histonů. Enzymové aktivity obou enzymů byly u studovaných neuroblastomových buněčných linií SK-N-AS, SH-SY5Y, UKF-NB-3 a UKF-NB-4 a v lidské buněčné linii A549 odvozené od alveolárního plicního karcinomu stanoveny kolorimetricky.

Lidské neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS, SH-SY5Y, UKF-NB-3 a UKF-NB4 a lidská buněčná linie A549 odvozená od alveolárního plicního karcinomu byly 24 hodin kultivovány při teplotě 37°C paralelně v normoxii a v hypoxii (O<sub>2</sub> 1 %). Následně byla provedena izolace jaderného buněčného extraktu za použití komerčního izolačního kitu (viz. kapitola 3.3.12 na str. 46). V každém vzorku obsahujícím extrahovanou jadernou proteinovou frakci byly v tripletu stanoveny aktivity HAT a HDAC. Vzájemné rozdíly mezi soubory aktivit naměřených ve vzorcích buněk jedné buněčné linie, kultivovaných při standardních kultivačních podmínkách a při nedostatku kyslíku, byly hodnoceny statisticky za použití dvouvýběrového studentova t-testu. Změny aktivity v normoxii a hypoxii charakterizovány  $p < 0,001$  byly považovány za statisticky velmi vysoce významné (\*\*\*),  $p < 0,01$  za statisticky velmi významné (\*\*),  $p < 0,05$  za statisticky významné (\*) a  $p > 0,05$  za statisticky nevýznamné.

Stanovení aktivity histonacetyltransferas (HAT) v izolovaných jaderných extraktech všech pěti buněčných linií bylo provedeno v 96ti-jamkové mikrotitrační destičce měřením optické denzity v jednotlivých vzorcích při vlnové délce 440 nm. Stanovená aktivita HAT lidské buněčné linie A549 odvozené od alveolárního plicního karcinomu s amplifikací onkogenu c-Myc byla za standardních i hypoxických kultivačních podmínek výrazně vyšší než aktivity HAT všech sledovaných neuroblastomových buněčných linií. Aktivita HAT buněčné linie A549 vykazovala mírné snížení v hypoxii oproti vzorkům kultivovaným za standardních podmínek. Tento rozdíl byl však považován za statisticky nevýznamný (viz. Obrázek č. 21 na str. 59).

Aktivita HAT v izolovaném jaderném buněčném extraktu lidské neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS (S-typ) bez amplifikace onkogenu N-Myc vykazovala statisticky významné snížení v hypoxii. Naproti tomu u lidské neuroblastomové buněčné linie SH-SY5Y (N-typ) bez amplifikace avšak se zmnožením tohoto onkogenu byl zaznamenán mírný statisticky nevýznamný nárůst aktivity HAT

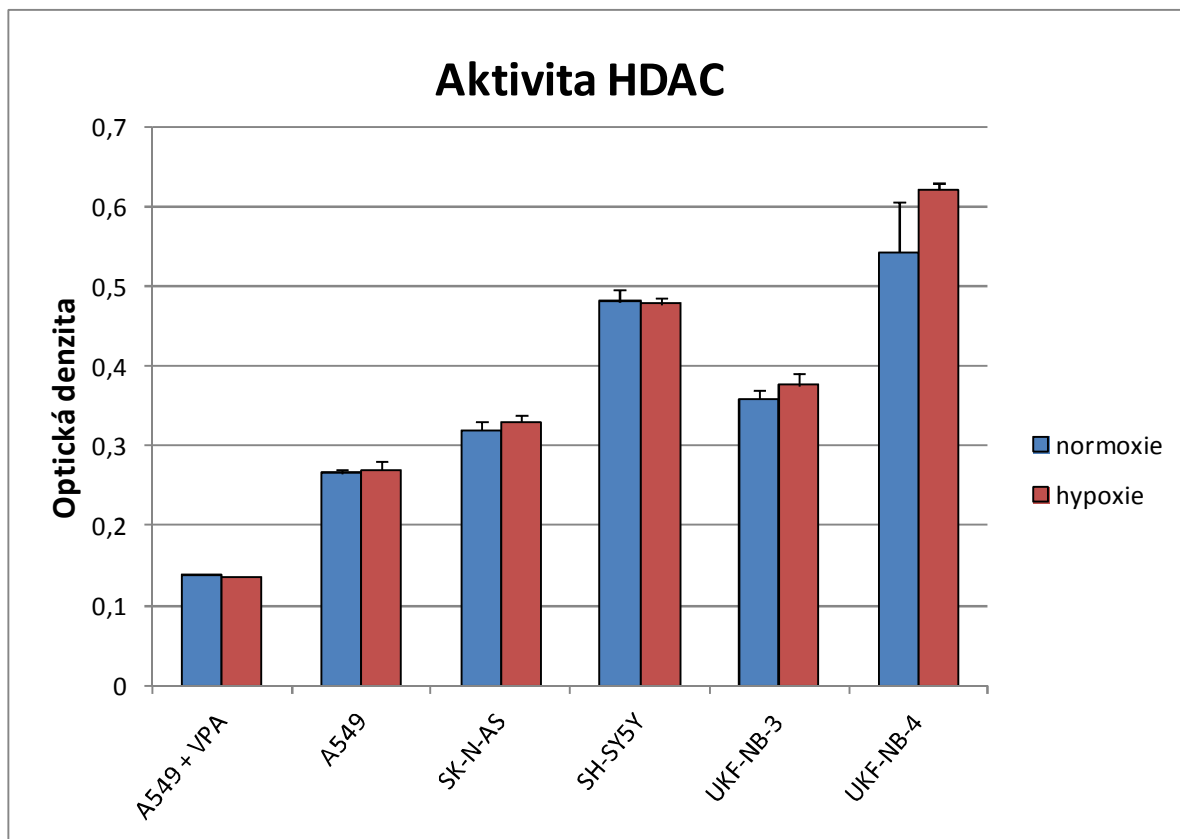
při kultivaci buněk v hypoxických kultivačních podmínkách ve srovnání s normoxií. Zatímco ve vzorcích lidské neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3 (N-typ) s amplifikací onkogenu N-Myc byl pozorován statisticky velmi významný rozdíl s výrazným poklesem aktivity HAT při kultivaci v hypoxických kultivačních podmínkách ve srovnání s normoxií, u buněčné linie UKF-NB-4 (S-typ) nebyla v hypoxii v aktivitě HAT zaznamenána žádná změna.



**Obrázek č. 21 - Aktivita HAT lidské buněčné linie A549 odvozené od alveolárního plicního karcinomu, 2 lidských neuroblastomových buněčných linií bez amplifikace N-Myc (SK-N-AS, SH-SY5Y) a 2 lidských neuroblastomových buněčných linií s amplifikací N-Myc (UKF-NB-3, UKF-NB-4), inkubovaných při teplotě 37°C paralelně v normoxii a hypoxii po dobu 24h: vzorky jednotlivých lidských buněčných linií o koncentraci 30  $\mu\text{g/ml}$  doplněny ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu 40  $\mu\text{l}$ . Statisticky hodnoceny vzájemné rozdíly mezi soubory aktivit naměřených ve vzorku jedné buněčné linie, inkubovaného při 37°C po dobu 24 hodin paralelně při standardních kultivačních podmínkách a při nedostatku kyslíku (hypoxie, O<sub>2</sub> 1 %), za použití dvouvýběrového studentova t-testu:  $p < 0,001$  statisticky velmi vysoce významné (\*\*\*),  $p < 0,01$  statisticky velmi významné (\*\*),  $p < 0,05$  statisticky významné (\*),  $p > 0,05$  statisticky nevýznamné.**

Vedle aktivity histonacetyltransferas (HAT) byla stanovována také aktivita histondeacetylas (HDAC), které v buňkách snižují hladinu acetylace histonů. Ta byla v izolovaných jaderných buněčných extraktech všech testovaných lidských buněčných linií stanovena kolorimetricky v 96ti-jamkové mikrotitrační destičce měřením optické denzity v jednotlivých vzorcích při vlnové délce 400 nm. Pro kontrolu věrohodnosti komerční soupravy byl použit stejně připravený vzorek jaderné frakce lidské buněčné linie A549 odvozené od alveolárního plicního karcinomu s přidavkem inhibitoru histondeacetylas, kyseliny valproové (VPA).

Statisticky nevýznamný rozdíl mezi aktivitou HDAC v normoxických a hypoxických kultivačních podmínkách byl pozorován u všech studovaných buněčných linií. Aktivita HDAC lidské buněčné linie A549 odvozené od alveolárního plicního karcinomu byla za standardních normoxických i hypoxických kultivačních podmínek nižší než sledované aktivity HDAC lidských neuroblastomových buněčných linií (viz. Obrázek č. 22 na str. 61). Ve vzorcích izolovaného jaderného buněčného extraktu lidských neuroblastomových buněčných linií bez amplifikace onkogenu N-Myc byla zaznamenána nepatrně zvýšená aktivita HDAC v hypoxii u buněčné linie SK-N-AS (S-typ) a naopak mírně snížená aktivita HDAC u buněčné linie SH-SY5Y (N-typ). Dalším výsledkem bylo mírné zvýšení aktivity HDAC v hypoxii u lidských neuroblastomových buněčných linií s amplifikací onkogenu N-Myc, UKF-NB-3 (N-typ) a UKF-NB-4 (S-typ).

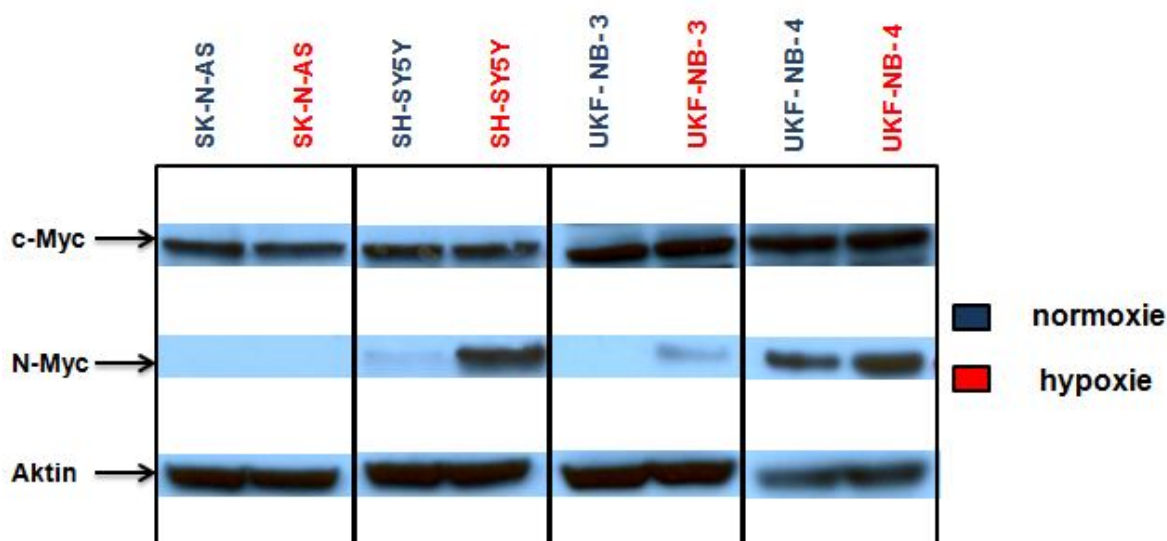


**Obrázek č. 22 - Aktivita HDAC lidské buněčné linie A549 odvozené od alveolárního plicního karcinomu s přidavkem a bez přidavku 100mM VPA (doba kultivace s VPA 1,5h), 2 lidských neuroblastomových buněčných linií bez amplifikace N-Myc (SK-N-AS, SH-SY5Y) a 2 lidských neuroblastomových buněčných linií s amplifikací N-Myc (UKF-NB-3, UKF-NB-4), inkubovaných při teplotě 37°C paralelně v normoxii a hypoxii po dobu 24h:** Kontrola věrohodnosti soupravy - normoxický A549 vzorek o koncentraci 30 µg/ml doplněn ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu 83 µl, ke kterému byly přidány 2 µl 100mM inhibitoru histondeacetylasy VPA, vzorky jednotlivých lidských buněčných linií o koncentraci 30 µg/ml doplněny ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu 85 µl. Statisticky hodnoceny vzájemné rozdíly mezi soubory aktivit naměřených ve vzorku jedné buněčné linie, inkubovaného při 37°C po dobu 24 hodin paralelně při standardních kultivačních podmínkách a při nedostatku kyslíku (hypoxie, O<sub>2</sub> 1 %), za použití dvouvýběrového studentova t-testu:  $p < 0,001$  statisticky velmi vysoce významné (\*\*\*),  $p < 0,01$  statisticky velmi významné (\*\*),  $p < 0,05$  statisticky významné (\*),  $p > 0,05$  statisticky nevýznamné.

### 4.3 Exprese onkogenů c-Myc a N-Myc

Ve vzorcích celobuněčných lyzátů studovaných lidských neuroblastomových buněčných linií (SK-N-AS, SH-SY5Y, UKF-NB-3 a UKF-NB-4) kultivovaných 24 hodin paralelně při standardních kultivačních podmínkách a při nedostatku kyslíku (hypoxie, O<sub>2</sub> 1 %) při teplotě 37°C byla nejprve kolorimetricky stanovena koncentrace celkového proteinu (viz. kapitola 3.3.9 na str. 43) a následně byla sledována exprese onkogenů c-Myc a N-Myc prostřednictvím metody Westernblot (viz. Obrázek č. 23 na str. 62). Pro detekci

c-Myc a N-myc onkogenů, jejichž molekulová hmotnost se v obou případech pohybuje okolo 67 kDa, byly používány specifické anti-c-Myc a anti-N-Myc protilátky od firmy Santa Cruz Biotechnology (USA).



**Obrázek č. 23 -** Expres onkogenů c-Myc a N-Myc ve 2 lidských neuroblastomových buněčných liniích bez amplifikace N-Myc (SK-N-AS, SH-SY5Y) a 2 lidských neuroblastomových buněčných liniích s amplifikací N-Myc (UKF-NB-3, UKF-NB-4), kultivovaných paralelně v normoxii a v hypoxii při teplotě 37°C po dobu 24h. Detekováno metodou Westernblot: SH-SY5Y, UKF-NB-4; Koncentrace všech vzorků 50 µg celkového proteinu. Doba expozice při vyvolávání: c-Myc: 10 sekund, N-Myc: linie s amplifikací N-Myc 10 sekund - 1minutu, linie bez amplifikace N-Myc 5-10 minut, aktin: 1 sekundu.

Ačkoliv exprese onkogenu c-Myc byla detekována u všech testovaných neuroblastomových linií, rozdíl v expresi tohoto onkogenu v normoxii a hypoxii nebyl patrný u žádné z nich. Expres onkogenu N-Myc byla metodou Westernblot detekována pouze u některých neuroblastomových buněčných linií. Konkrétně se jednalo o buněčnou linii SH-SY5Y (N-ty) bez amplifikace avšak se zmnožením N-Myc onkogenu, buněčnou linii UKF-NB-3 (N-ty) s amplifikací N-Myc onkogenu a buněčnou linii UKF-NB-4 (S-ty) také s amplifikací N-Myc onkogenu. Expres N-Myc onkogenu byla po 24 hodinové kultivaci buněk při nedostatku kyslíku (hypoxie, O<sub>2</sub> 1 %) ve srovnání se standardními kultivačními podmínkami zvýšena. Nanesení shodného množství proteinu do jamek při elektroforetické separaci bylo ověřeno standardním postupem detekce exprese aktinu.

## 5 Diskuse

Nedostatečná a neuspořádaná vaskularizace je v rychle rostoucích lidských solidních nádorech zodpovědná za vznik oblastí bez přístupu kyslíku, s nímž se nádorové buňky vyrovnávají například prostřednictvím angiogeneze, posíleného metabolismu glukosy nebo snížené mitochondriální respirace. Tato adaptace jde ruku v ruce s přestavbou chromatinu a epigenetickou regulací metabolismu zahrnující mimo jiné posttranslační modifikace histonů.<sup>10</sup> V předkládané diplomové práci byly sledovány změny v acetylaci histonů H3 a H4 neuroblastomových buněčných linií vyvolané 24 hodinovou kultivací při nedostatku kyslíku (hypoxie, O<sub>2</sub> 1 %) v porovnání s kultivací za standardních podmínek. Konkrétně se jednalo o lidské neuroblastomové buněčné linie s amplifikací onkogenu N-Myc (UKF-NB-3 a UKF-NB-4) a lidské neuroblastomové buněčné linie bez amplifikace onkogenu N-Myc (SK-N-AS a SH-SY5Y).

Kvalita a způsob izolace a purifikace histonů byly zásadním faktorem při přípravě vzorků pro sledování acetylace histonů metodou Westernblot. Zatímco příliš agresivní podmínky izolace, jako například špatně zvolené lyzační médium, mohly způsobit denaturaci nebo zničení histonů, při nedostatečně účinných podmínkách izolace mohly být histony ztraceny v nerozpustné frakci.<sup>121,108</sup> Použití vhodné kombinace extrakčních reagensů a inhibitorů bylo zásadní pro získání čistých frakcí obsahujících histony, bez porušení jejich nativních postranslačních modifikací.<sup>118</sup> Ačkoliv acetylace histonů patří mezi stabilnější posttranslační modifikace, které by v kyselém prostředí neměly podléhat žádným dodatečným změnám, v případě zvolení nevhodného izolačního postupu mohlo docházet k poškození acetylačního stavu histonů katalyzovanému celou řadou enzymů, jejichž inhibitory dosud nejsou zcela známy.<sup>108</sup>

V této diplomové práci byla pro izolaci a purifikaci histonů používána kyselá extrakce s následnou dialýzou dle postupu popsaného v pracovním listě k protilátce H4 (Lot#29867) od firmy Upstate,<sup>106</sup> která byla poté zcela nahrazena kyselou extrakcí s následným srážením TCA dle D. Shechter a kol.<sup>108</sup> Buněčná linie A549 odvozená z alveolárního plicního karcinomu od firmy ATCC, se kterou byly ve studii Q. Li a M. Costy z r. 2009<sup>10</sup> obdobné experimenty provedeny, byla používána pro porovnání změn acetylace histonů H3 a H4 všech studovaných neuroblastomových buněčných linií. Výsledky sledování změn acetylace histonů H3 a H4 se v případě jedné i druhé extrakční metody používané pro přípravu vzorků v této diplomové práci takřka shodovaly. V obou

případech bylo pozorováno v hypoxických kultivačních podmínkách zvýšení acetylace histonů H4 neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-3 (N-tyt) a UKF-NB-4 (S-tyt), které mají amplifikaci onkogenu N-Myc. Buněčná linie SH-SY5Y byla laboratoří zakoupena až později a změny v hladině acetylace histonů H3 a H4 byly tedy u této buněčné linie sledovány pouze prostřednictvím nové extrakční metody s následným srážením TCA dle D. Shechter a kol.<sup>108</sup>, kdy bylo metodou Westernblot zřetelně pozorováno zvýšení acetylace histonů H3 a H4 v hypoxii. Jediným případem, kdy obě metody extrakce poskytovaly rozdílné změny v hladinách acetylace histonů H3 a H4 v normoxii a hypoxii, byla tedy neuroblastomová buněčná linie SK-N-AS. Zatímco původní metodou extrakce s následnou dialýzou<sup>106</sup> bylo u této buněčné linie pozorováno po 24h kultivaci v hypoxii výrazné snížení acetylace histonů H4, v případě nové extrakční metody za použití následného srážení TCA dle D. Shechter a kol.<sup>108</sup> nebyla změna acetylace těchto histonů v normoxických a hypoxických podmínkách zaznamenána.

Rovnováha mezi acetylací a deacetylací histonů je v buňce udržována hladinami aktivity enzymů histonacetyltransferas (HAT) a histondeacetylas (HDAC). Ačkoliv přímá změna exprese těchto enzymů v nádorových buňkách nebyla doposud prokázána, je známo, že HAT a HDAC asociují s celou řadou buněčných onkogenů a nádorových supresorových genů. Z hlediska neuroblastomů je zajímavá rodina onkogenů Myc, jejíž členové tvoří DNA-vazebné heterodimery s proteinem Max. Takto vychytávají koaktivační komplexy obsahující HAT, které generují změny ve struktuře chromatinu a aktivují transkripci.<sup>122</sup>

V předkládané diplomové práci byly aktivity jaderných enzymů HAT a HDAC studovaných neuroblastomových linií stanoveny kolorimetricky po 24 hodinové kultivaci buněk za standardních kultivačních podmínek respektive v hypoxii (O<sub>2</sub> 1 %). Stanovení obou enzymových aktivit v testovaných lidských neuroblastomových buněčných liniích a v lidské buněčné linii A549 odvozené od plicního alveolárního karcinomu bylo dáno do souvislosti s výsledkem detekce acetylace histonů H3 a H4 po 24h kultivaci při normoxických podmínkách a při nedostatku kyslíku, provedené metodou Westernblot za použití extrakční metody s následným srážením TCA dle D. Shechter a kol.<sup>108</sup>. Bylo zjištěno, že v hypoxii snížená enzymová aktivita HAT a zvýšená enzymová aktivita HDAC u buněčné linie A549 s amplifikací onkogenu c-Myc odvozené od alveolárního plicního karcinomu korelovaly s výrazným snížením acetylace histonů H3 a H4 v hypoxii, detekovaným metodou Westernblot. Shoda ve změně acetylace histonů získaných oběma



metodami byla sledována i u buněčné linie SH-SY5Y (N-ty) bez amplifikace onkogenu N-Myc. Ve vzorcích buněk kultivovaných 24 hodin za nedostatku kyslíku bylo metodou Westernblot pozorováno zvýšení acetylce histonů H3 a H4 oproti normoxickým vzorkům, enzymová aktivita HAT byla v hypoxii zvýšená a enzymová aktivita HDAC naopak mírně snížena. Ačkoliv stanovení obou enzymových aktivit ve vzorcích izolovaného jaderného buněčného extraktu buněčné linie SK-N-AS nahrávalo obdobné změně acetylce jako u buněčné linie A549, tj. s výrazným snížením aktivity HAT a naopak zvýšením aktivity HDAC v hypoxii, metodou Westernblot nebyl rozdíl v acetylaci histonů H3 a H4 při kultivaci buněk v normoxii a hypoxii prokázán.

Naproti tomu změna enzymových aktivit HAT a HDAC v lidských neuroblastomových buněčných liniích s amplifikací onkogenu N-Myc, se změnou acetylce sledované prostřednictvím metody Westernblot, nekorelovala. Zatímco metodou Westernblot byla u neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-3 (N-ty) a UKF-NB-4 (S-ty) detekována zvýšená acetylce histonů H4 v hypoxii, snížená enzymová aktivita HAT a zvýšená enzymová aktivita HDAC u těchto linií v hypoxii naznačovaly naopak snížení acetylce histonů u hypoxických buněk. Vzhledem k neznámé čistotě izolace jaderné frakce použité pro kolorimetrické stanovení enzymových aktivit HAT a HDAC, mohly být však výsledné aktivity obou enzymů zásadně ovlivněny HAT a HDAC lokalizovanými jinde než v buněčném jádře.

Klíčovou roli při hypoxickém stresu a změně acetylce histonů hrají také hladiny exprese onkogenů N-Myc a c-Myc,<sup>5,8</sup> které aktivují transkripci glykolytických genů typických pro Warburgův efekt v nádorové buňce<sup>3</sup> a dalších cílových genů spojených obecně se špatnou prognózou nádorového onemocnění.<sup>123</sup> Společně oba onkogeny ovlivňují proliferační a apoptotické dráhy, které jsou podstatné pro rozvoj maligních onemocnění. Vzhledem k tomu, že neuroblastomové buněčné linie se zvýšenou amplifikací N-Myc mohou podstoupit apoptózu či neuronální diferenciaci, lze se domnívat, že N-Myc je buď sám do maligní progresu těchto nádorů aktivně zapojen, nebo je kompatibilní se spontánní regresí neuroblastomu o příznivé prognóze. Oproti tomu funkční role N-Myc v nádorech s jeho nízkou expresí je sporná a předpokládá se význam dalších transkripčních faktorů Myc rodiny, o čemž svědčí i fakt, že v buněčných liniích odvozených z neuroblastomu bez amplifikace N-Myc je obecně pozorována exprese onkogenu c-Myc často na vyšší úrovni než v normálních zdravých tkáních.<sup>124</sup>

Tyto poznatky potvrzují i výsledky předkládané diplomové práce. Experimentálně bylo zjištěno, že hypoxie je u neuroblastomových nádorových buněk s amplifikací či zmnožením onkogenu N-Myc (UKF-NB-3, UKF-NB-4, SH-SY5Y) zodpovědná za zvýšenou acetylaci histonů H4 spojenou se zvýšením exprese genu N-Myc na úrovni proteinu. Naprosto odlišný výsledek byl pozorován u lidské buněčné linie A549, odvozené od plicního alveolárního karcinomu, která dle výsledků studie Q. Li a M. Costy z r. 2009<sup>10</sup> a následně i dle výsledků získaných v této diplomové vykazuje snížení acetylace histonů H4 v hypoxii, spojené se snížením exprese onkogenu c-Myc. U buněčné linie SK-N-AS bez amplifikace onkogenu N-Myc exprese tohoto onkogenu na úrovni proteinu v hypoxii nebyla detekována. Ačkoliv se funkce onkogenů c-Myc a N-Myc často překrývají, přesný vztah mezi nimi doposud nebyl definován.

## 6 Závěr

Předkládaná diplomová práce přispívá k rozšíření znalostí v oblasti vlivu kultivačních podmínek (nedostatku kyslíku) na změnu v hladině acetylace histonů H3 a H4 a vztahem k expresi proto-onkogenů N-Myc a c-Myc na úrovni proteinu.

- Byla vybrána a optimalizována vhodná metoda izolace a purifikace frakce obsahující histony pro následné sledování změny acetylace histonů H3 a H4 metodou Westernblot.
- Byly sledovány změny v acetylaci histonů H3 a H4 neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-3, UKF-NB-4, SH-SY5Y a SK-N-AS metodou Westernblot po 24h vystavení studovaných buněk hypoxii.
- Byla kolorimetricky stanovena aktivita histonacetyltransferas a histondeacetylasy v neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-3, UKF-NB-4, SH-SY5Y a SK-N-AS kultivovaných paralelně 24h v normoxii a hypoxii.
- Byla stanovena exprese proto-onkogenů N-Myc a c-Myc metodou Westernblot v závislosti na kultivačních podmínkách (normoxie versus 24h hypoxie).

## 7 Použitá literatura

1. Yun, J., Johnson, J. L., Hanigan, C. L. & Locasale, J. W. Interactions between epigenetics and metabolism in cancers. *Frontiers in oncology* **2**, 1–10 (2012).
2. Johnson, A. B., Denko, N. & Barton, M. C. Hypoxia induces a novel signature of chromatin modifications and global repression of transcription. *Mutation research* **640**, 174–179 (2008).
3. Kim, H., Joo H., Kim, T., Kim, E., Park, S. J., Park, J. K. & Kim, H. J. The Mitochondrial Warburg Effect: A Cancer Enigma. *Interdisciplinary Bio Central* **1**, 1–7 (2009).
4. Patten, D. A., Lafleur, V. N., Robitaille, G. A., Chan, D. A., Giaccia, A. J. & Richard, D. E. Hypoxia-inducible Factor-1 Activation in Nonhypoxic Conditions : The Essential Role of Mitochondrial-derived Reactive Oxygen Species. *Molecular Biology of the Cell* **21**, 3247–3257 (2010).
5. Hsu, P. P. & Sabatini, D. M. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* **134**, 703–707 (2008).
6. Krivoruchko, A. & Storey, K. B. Epigenetics in anoxia tolerance: a role for histone deacetylases. *Molecular and cellular biochemistry* **342**, 151–161 (2010).
7. Levine, A. J. & Puzio-Kuter, A. M. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science* **330**, 1340–1344 (2010).
8. Maxwell, P. H., Wiesener, M. & Chang, G. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**, 271–275 (1999).
9. Godfried, M. B., Veenstra, M., Sluis, P., Boon, K., Asperen, R., Hermus, M. Ch., Schaik, B. DC, Voute, T. PA, Schwab, M., Versteeg, R. & Caron, H. N. The N-myc and c-myc downstream pathways include the chromosome 17q genes nm23-H1 and nm23-H2. *Oncogene* **21**, 2097–2101 (2002).

10. Li, Q. & Costa, M. c-Myc Mediates a Hypoxia-Induced Decrease in Acetylated Histone H4. *Biochimie* **91**, 1307–1310 (2009).
11. Spencer, V. A. & Davie, J. R. Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene* **240**, 1–12 (1999).
12. Li, S. Implication of posttranslational histone modifications in nucleotide excision repair. *International journal of molecular sciences* **13**, 12461–12486 (2012).
13. Davie, J. R. & Spencer, V. A. Control of histone modifications. *Journal of cellular biochemistry* **32-3**, 141–148 (1999).
14. Beneke, S. Regulation of chromatin structure by poly(ADP-ribosyl)ation. *Frontiers in genetics* **3**, 1-16 (2012).
15. Lee, K. M. & Hayes, J. J. Linker DNA and H1-dependent reorganization of histone-DNA interactions within the nucleosome. *Biochemistry* **37**, 8622–8628 (1998).
16. Luger, K. & Collins, F. Nucleosomes: Structure and Function. *Encyclopedia of Life Sciences* 1–8 (2001).
17. Li, G. & Reinberg, D. Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Current opinion in genetics & development* **21**, 175–186 (2011).
18. Makalowska, I., Ferlanti, E. S., Baxevanis, a D. & Landsman, D. Histone Sequence Database: sequences, structures, post-translational modifications and genetic loci. *Nucleic acids research* **27**, 323–324 (1999).
19. Wanner, G., Schroeder-Reiter, E. & Formanek, H. 3D Analysis of chromosome architecture: advantages and limitations with SEM. *Cytogenetic and Genome Research* 70–78 (2005).
20. Richmond, R. K., Sargent, D. F., Richmond, T. J., Luger, K. & Ma, A. W. Crystal structure of the nucleosome resolution core particle at 2.8Å resolution. *Nature* **389**, 251–260 (1997).

21. Workman, J. L. & Kingston, R. E. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annual review of biochemistry* **67**, 545–579 (1998).
22. Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693–705 (2007).
23. Dinant, C., Houtsmuller, A. B. & Vermeulen, W. Chromatin structure and DNA damage repair. *Epigenetics & chromatin* **1**, 1-13 (2008).
24. Li, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature reviews Genetics* **3**, 662–673 (2002).
25. Křížová, M. Hlavní markery epigenetické regulace a jejich vizualizace. Bakalářská práce PŘF Masarykova univerzita, katedra biochemie, 10–22 (2006).
26. Jayani, R. S., Ramanujam, P. L. & Galande, S. Studying histone modifications and their genomic functions by employing chromatin immunoprecipitation and immunoblotting. *Methods in cell biology* **98**, 35–56 (2010).
27. Iizuka, M. & Smith, M. M. Functional consequences of histone modifications. *Current Opinion in Genetics & Development* **13**, 154–160 (2003).
28. Hirschhorn, J. N., Brown, S. A., Clark, C. D. & Winston, F. Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes & Development* **6**, 2288–2298 (1992).
29. Herman, J. G. & Baylin, S. B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *The New England journal of medicine* **349**, 2042–2054 (2003).
30. Luger, K. & Richmond, T. J. The histone tails of the nucleosome. *Current Opinion in Genetics & Development* **140–146** (1998).
31. Bannister, A. J. & Kouzarides, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research* **21**, 381–395 (2011).

32. Zhu, P., Zhou, W., Wang, J., Puc, W., Oghi, K. A., Erdjument-Bromage H., Tempst, P., Glass, Ch. K. & Rosenfeld, M. G. A histone H2A deubiquitinase complex coordinating histone acetylation and H1 dissociation in transcriptional regulation. *Molecular Cell* **27**, 609–621 (2007).
33. Cuthbert, G. L., Daujat, S., Snowden, A. W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P. D., Tempst, P., Bannister, A. J. & Kouzarides T. Histone Deimination Antagonizes Arginine Methylation. *Cell* **118**, 545–553 (2004).
34. Lee, J.-S., Shukla, A., Schneider, J., Swanson, S. K., Washburn, M. P., Florens, L., Bhaumik S. R. & Shilatifard A. Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS. *Cell* **131**, 1084–1096 (2007).
35. Shilatifard, A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annual review of biochemistry* **75**, 243–269 (2006).
36. Hathaway, N. A., Bell, O., Hodges, C., Miller, E. L., Neel D.S. & Crabtree, G. R. Dynamics and Memory of Heterochromatin in Living Cells. *Cell* **149**, 1447–1460 (2012).
37. Nelson, C. J., Santos-Rosa, H. & Kouzarides, T. Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression. *Cell* **126**, 905–916 (2006).
38. Zhang, Y. & Reinberg, D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & development* **15**, 2343–2360 (2001).
39. Fodor, B. D., Kubicek, S., Yonezawa, M., O’Sullivan, R. J., Sengupta, R., Perez-Burgos, L., Opravil, S., Mechtler, K., Schotta, G. & Jenuwein, T. Jmjd2b antagonizes H3K9 trimethylation at pericentric heterochromatin in mammalian cells. *Genes & Development* **20**, 1557–1562 (2006).
40. Sims, R. J., Nishioka, K. & Reinberg, D. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends in genetics* **19**, 629–639 (2003).

41. Bártová, E., Krejčí, J., Harničarová, A., Galiová, G. & Kozubek, S. Histone modifications and nuclear architecture: a review. *Journal of histochemistry and cytochemistry* **56**, 711–721 (2008).
42. Zhou, V. W., Goren, A. & Bernstein, B. E. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nature reviews Genetics* **12**, 7–18 (2011).
43. Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, Ch., Allis, C. D. & Jenuwein, T. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**, 593–599 (2000).
44. Banerjee, T. & Chakravarti, D. A peek into the complex realm of histone phosphorylation. *Molecular and cellular biology* **31**, 4858–4873 (2011).
45. Dastidar, E. G., Dzek, K., Krijgsveld, J., Malmquist, N.A., Doerig Ch., Scherf, A. & Lopez-Rubio J. J. Comprehensive histone phosphorylation analysis and identification of Pf14-3-3 protein as a histone H3 phosphorylation reader in malaria parasites. *PloS one* **8**, 1–12 (2013).
46. Metzger, E., Yin, N., Wissmann, M., Kunowska, N., Fischer, K., Friedrichs, N., Patnaik, D., Higgins J. M. G., Pottier N., Scheidtmann, K.H., Buettner, R. & Schule R. Phosphorylation of histone H3 at threonine establishes a novel chromatin mark for transcriptional regulation. *Nature Cell Biology* **10**, 53–60 (2008).
47. Lonze, B. E. & Ginty, D. D. Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System CREB and its close relatives are now widely accepted. *Neuron* **35**, 605–623 (2002).
48. Bito, H., Deisseroth, K. & Tsien, R. W. CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* **87**, 1203–1214 (1996).
49. Wen, A. Y., Sakamoto, K. M. & Miller, L. S. The role of the transcription factor CREB in immune function. *Journal of immunology* **185**, 6413–6419 (2010).



50. Wu, G. Y., Deisseroth, K. & Tsien, R. W. Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 2808–2813 (2001).
51. Chan, H. M. & La Thangue, N. B. p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *Journal of cell science* **114**, 2363–2373 (2001).
52. Mayr, B. & Montminy, M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor creb. *Nature reviews Molecular cell biology* 599–609 (2001).
53. Conaway, R. C., Brower, C. S. & Conaway, J. W. Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science* **296**, 1254–1258 (2002).
54. Espinosa, J. M. Histone H2B ubiquitination : the cancer connection. *Genes & Development* 2743–2749 (2008).
55. Weake, V. M. & Workman, J. L. Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Molecular cell* **29**, 653–663 (2008).
56. Cao, J. & Yan, Q. Histone ubiquitination and deubiquitination in transcription, DNA damage response, and cancer. *Frontiers in oncology* **2**, 1–9 (2012).
57. Hottiger, M. O. ADP-ribosylation of histones by ARTD1: an additional module of the histone code? *FEBS letters* **585**, 1595–1599 (2011).
58. Messner, S., Altmeyer, M., Zhao, H., Pozivil, A., Roschitzki, B., Gehrig, P., Rutishauser, D., Huang, D., Caflisch, A. & Hottiger M. O. PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails. *Nucleic acids research* **38**, 6350–6362 (2010).
59. Hassa, P. O., Haenni, S. S., Elser, M. & Hottiger, M. O. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiology and molecular biology reviews* **70**, 789–829 (2006).

60. Martinez-Zamudio, R. & Ha, H. C. Histone ADP-ribosylation facilitates gene transcription by directly remodeling nucleosomes. *Molecular and cellular biology* **32**, 2490–2502 (2012).
61. Mukhopadhyay, D. & Dasso, M. Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends in biochemical sciences* **32**, 286–295 (2007).
62. Nathan, D., Ingvarsdottir, K., Sterner, D. E., Bylebyl G. R., Dokmanovic M., Dorsey, J. A., Whelan, K. A., Krsmanovic, M., Lane, W.S., Meluh, P. B., Johnson, E. S. & Berger, S.L. Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes & development* **20**, 966–976 (2006).
63. Nathan, D., Sterner, D. E. & Berger, S. L. Histone modifications: Now summoning sumoylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 13118–13120 (2003).
64. Lyst, M. J. & Stancheva, I. UKPMC Funders Group UKPMC Funders Group Author Manuscript A role for SUMO modification in transcriptional repression and activation. *Biochemical Society Transactions* **35**, 1389–1392 (2010).
65. Ouyang, J. & Gill, G. SUMO engages multiple corepressors to regulate chromatin structure and transcription. *Epigenetics* **4**, 440–444 (2009).
66. Sassone-Corsi, P. Physiology. When metabolism and epigenetics converge. *Science* **339**, 148–150 (2013).
67. Shimazu, T., Hirschey, M. D., Newman, J., He, W., Shirakawa, K., Le Moan, N., Grueter, C. A., Lim, H., Saunders L. R., Stevens R. D., Newgard Ch. B., Farese R. B., de Cabo, R., Ulrich, S., Akassoglou, K. & Verdin E. Suppression of oxidative stress by  $\beta$ -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science* **339**, 211–214 (2013).
68. Bannister, a J. & Miska, E. a Regulation of gene expression by transcription factor acetylation. *Cellular and molecular life sciences* **57**, 1184–1192 (2000).

69. Barnes, P. J., Adcock, I. M. & Ito, K. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *European respiratory journal* **25**, 552–563 (2005).
70. Markowetz, F., Mulder, K. W., Airoidi, E. M., Lemischka, I. R. & Troyanskaya, O. G. Mapping dynamic histone acetylation patterns to gene expression in nanog-depleted murine embryonic stem cells. *PLoS computational biology* **6**, 1–11 (2010).
71. Sterner, D. E. & Berger, S. L. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiology and molecular biology reviews* **64**, 435–459 (2000).
72. Fukuda, H., Sano, N., Muto, S. & Horikoshi, M. Simple histone acetylation plays a complex role in the regulation of gene expression. *Briefings in functional genomics & proteomics* **5**, 190–208 (2006).
73. Sharp, S. E., Gelfand, M. J. & Shulkin, B. L. Pediatrics: diagnosis of neuroblastoma. *Seminars in nuclear medicine* **41**, 345–353 (2011).
74. Howman-Giles, R., Shaw, P. J., Uren, R. F. & Chung, D. K. V Neuroblastoma and other neuroendocrine tumors. *Seminars in nuclear medicine* **37**, 286–302 (2007).
75. Esiashvili, N., Anderson, C. & Katzenstein, H. M. Neuroblastoma. *Current problems in cancer* **33**, 333–360 (2009).
76. Neuroblastoma In An Adult. *International Journal of Internal Medicine* **9** (2011).at <<http://www.ispub.com/journal/the-internet-journal-of-internal-medicine/volume-9-number-1/neuroblastoma-in-an-adult.html#sthash.4wKAMBuW.dpbs>>, 16.1.2013 21:00.
77. Brodeur, G. M. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature Reviews Cancer* **3**, 203–216 (2003).
78. Wood, L. & Lowis, S. An update on neuroblastoma. *Paediatrics and Child Health* **18**, 123–128 (2008).
79. Klener P. *Klinická onkologie*. 621–624 (Galén, Karolinum: 2002).

80. Sano, H., Bonadio, J., Gerbing, R. B., London, W. B., Matthay, K. K., Lukens, J. N. & Shimada, H. International neuroblastoma pathology classification adds independent prognostic information beyond the prognostic contribution of age. *European journal of cancer* **42**, 1113–1119 (2006).
81. Corey, J. M., Gertz C. C., Sutton, T. J., Chen, Q., Mycek, K. B., Wang, B. S., Martin A. A., Johnson, S. L. & Feldman, E. Patterning N-type and S-type Neuroblastoma Cells with Pluronic F108 and ECM Proteins. *Journal of Biomedical Materials* **93**, 673–686 (2011).
82. Ross, R. A., Biedler, J. L. & Spengler, B. A. A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors. *Cancer letters* **197**, 35–39 (2003).
83. Isaacs, J. S., Hardman, R., Carman, T. A., Barrett, J. C. & Weissman, B. E. Differential Subcellular p53 Localization and Function in N- and S-Type Neuroblastoma Cell Lines. *Cell Growth & Differentiation* **9**, 545–555 (1998).
84. Walton, J. D., Kattan, D. R., Thomas, S. K., Splenger, B. A., Guo, H. F., Biedler, J. L., Cheung, N. K. V. & Ross, R. A. Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. *Neoplasia* **6**, 838–845 (2004).
85. Okoye, B. O. Solid tumours of childhood. *Surgery* **28**, 382–386 (2010).
86. George, R. E., Sanda, T., Hanna, M., Frohling, S., Luther II, W., Zhang, J., Ahn, Y., Zhou, W., London, B. W., McGrady, P., Xue, L., Zozoluya, S., Gregor, V., Webb, T. R., Gray, N. S., Gilliland, D.G., Diller, L., Greulich, H., Morris, S. W., Meyerson, M. & Look, A.T. Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* **455**, 975–978 (2008).
87. Hallett, A. & Traunecker, H. A review and update on neuroblastoma. *Paediatrics and Child Health* **22**, 103–107 (2012).
88. Yang, H. W. *et al.* Genomic structure and mutational analysis of the human KIF1B gene which is homozygously deleted in neuroblastoma at chromosome 1p36.2. *Oncogene* **20**, 5075–5083 (2001).

89. Evans, E. A Proposed Staging For Children With Neuroblastoma. *Cancer* **27**, 374–378 (1970).
90. Procházka, P., Hraběta, J., Vícha, A., Cipro, Š., Stejskalová, E., Musil, Z., Vodička, P. & Eckschlager, T. Changes in MYCN expression in human neuroblastoma cell lines following cisplatin treatment may not be related to MYCN copy numbers. *Oncology reports* **29**, 2415–2421 (2013).
91. Maris, J. M., Hogarty, M. D., Bagatell, R. & Cohn, S. L. Neuroblastoma. *Lancet* **369**, 2106–2120 (2007).
92. Thiele, C. J. Neuroblastoma Cell Lines. **1**, 1–35 (1998).
93. Arul, G. S./Birmingham Children's Hospital, U. Neuroblastoma. *Paediatric II* 309–311 (2007).
94. Mazánek, P., Bajčiová, V., Múdry, P., Štěrbá, J. Léčba dětí s neuroblastomem na Klinice dětské onkologie v letech 1998-2003. XXVII. Konference Brněnské onkologické dny, Brno (2004).
95. Patel, S. A. & Simon, M. C. Biology of Hypoxia-Inducible Factor-2 $\alpha$  in Development and Disease HHMI Author Manuscript. *Cell death and differentiation* **15**, 628–634 (2008).
96. Bertout, J. A., Patel, S. A. & Simon, M. C. The impact of O<sub>2</sub> availability on human cancer. *Nature Reviews Cancer* **8**, 967–975 (2011).
97. Trédan, O., Galmarini, C. M., Patel, K. & Tannock, I. F. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute* **99**, 1441–1454 (2007).
98. Gilany, K. & Vafakhah, M. Hypoxia : a Review. *Journal of Paramedical Sciences* **1**, 43–60 (2010).

99. Semenza, G. L. & Wang, G. L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Molecular and cellular biology* **12**, 5447–5454 (1992).
100. Chen, S. & Sang, N. Histone deacetylase inhibitors: the epigenetic therapeutics that repress hypoxia-inducible factors. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2011**, 1–14 (2011).
101. Welsh, S. J., Koh, M. Y. & Powis, G. The hypoxic inducible stress response as a target for cancer drug discovery. *Seminars in oncology* **33**, 486–497 (2006).
102. Semenza, G. L. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochemical pharmacology* **59**, 47–53 (2000).
103. Semenza, G. L. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Current Opinion in Cell Biology* **13**, 167–171 (2001).
104. Qing, G., Skuli, N., Mayes, P. A., Pawel, B., Martinez, D., Maris, J. M. & Simon, M. C. Combinatorial regulation of neuroblastoma tumor progression by N-Myc and hypoxia inducible factor HIF-1alpha. *Cancer research* **70**, 10351–10361 (2010).
105. Harris, R. G., White, E., Phillips, E. S. & Lillycrop, K. A. The expression of the developmentally regulated proto-oncogene Pax-3 is modulated by N-Myc. *Journal of biological chemistry* **277**, 34815–34825 (2002).
106. Upstate Certificate of Analysis Anti-acetyl-Histone H4. **4**, 7–9 (2003).
107. Harvard Apparatus Micro DispoDialyzer Instructions for use. 5–6
108. Shechter, D., Dormann, H. L., Allis, C. D. & Hake, S. B. Extraction, purification and analysis of histones. *Nature protocols* **2**, 1445–1457 (2007).
109. BioVision Nuclear/Cytosol Fractionation kit. at  
<<http://www.biovision.com/manuals/K266-100.pdf>>, 15.12. 2012 14:01.
110. Biovision HAT Activity Colorimetric Assay Kit. 10–11at  
<<http://www.biovision.com/manuals/K332-100.pdf>>, 14.12.2012 20:45.

111. BioVision Colorimetric HDAC Activity Assay Kit. 1–2at  
<<http://www.biovision.com/manuals/K331-100.pdf>>, 14.12.2012 19:00.
112. Perez-Perri, J. I., Acevedo, J. M. & Wappner, P. Epigenetics: new questions on the response to hypoxia. *International journal of molecular sciences* **12**, 4705–4721 (2011).
113. Turner, B. M. Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays* **22**, 836–845 (2000).
114. Qian, D. Z., Kachhap S. & Collis S. Class II histone deacetylases are associated with VHL-independent regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Cancer research* **66**, 8814–8821 (2006).
115. Frank, S. R., Schroeder, M., Fernandez, P., Taubert, S. & Amati, B. Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation. *Genes & Development* **15**, 2069–2082 (2001).
116. Jögi, A., Ora, I., Nilsson, H., Lindeheim, A., Makino, Y., Poellinger, L., Axelson, H. & Pahlman, S. Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 7021–7026 (2002).
117. Van Maerken, T., Ferdinande, L., Taldeman, J., Lambertz, I., Yigit, N., Vercruysse, L., Rihani, A., Michaelis, M., Cinatl, J., Cuvelier C. A., Marine, J.Ch., De Paepe, A., Bracke, M., Speleman, F. & Vandesompele J. Antitumor activity of the selective MDM2 antagonist nutlin-3 against chemoresistant neuroblastoma with wild-type p53. *Journal of the National Cancer Institute* **101**, 1562–1574 (2009).
118. Rodriguez-Collazo, P., Leuba, S. H. & Zlatanova, J. Robust methods for purification of histones from cultured mammalian cells with the preservation of their native modifications. *Nucleic acids research* **37**, 1–15 (2009).
119. Bonner, W. M., West, M. H. & Stedman, J. D. Two-dimensional gel analysis of histones in acid extracts of nuclei, cells, and tissues. *European journal of biochemistry* **109**, 17–23 (1980).

120. Poljaková, J., Hraběta, J., Eckschlager, T. & Stiborová, M. Study of neuroblastoma cells under hypoxia. TOXCON 2011, Praha (2011).
121. Gutierrez, S., Cappione, A., Strug, I. & Smith, J. Evaluation of common protein extraction reagents in mammalian and bacteria lysates, by infrared (IR) based quantification and Western blotting. 4993 (2012).at  
<[http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/d406c20c7474429e85257a830061343b/\\$FILE/PS4993EN00\\_EMD.pdf](http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/d406c20c7474429e85257a830061343b/$FILE/PS4993EN00_EMD.pdf)>, 15. 3. 2013 18:30.
122. Ruijter, A. J. M. D. E., Gennip, A. H. V. A. N., Caron, H. N., Kemp, S. & Kuilenburg, A. B. P. V. A. N. Histone deacetylases ( HDACs ) : characterization of the classical HDAC family. *Biochemical Journal* **370**, 737–749 (2003).
123. Mestdagh, P., Fredlund E. & Pattyn F. MYCN/c-MYC-induced microRNAs repress coding gene networks associated with poor outcome in MYCN/c-MYC-activated tumors. *Oncogene* **29**, 1394–1404 (2010).
124. Westermann, F., Muth D. & Benner A. Distinct transcriptional MYCN/c-MYC activities are associated with spontaneous regression or malignant progression in neuroblastomas. *Genome biology* **9**, 1-14 (2008).



„Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.“

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka
-------------------------------	----------	-----------------	----------